(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号

特表2005-507247

(P2005-507247A)

(43)公表日　平成17年3月17日(2005.3.17)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A61K 31/7105	A61K	31/7105		4B063
A61K 35/76	A61K	35/76		4B064
A61K 38/00	A61K	39/395	D	4B065
A61K 39/395	A61K	39/395	N	4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 149 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-530838(P2003-530838)
(86)(22)出願日　平成14年2月20日(2002.2.20)
(85)翻訳文提出日　平成16年3月25日(2004.3.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/005234
(87)国際公開番号　WO2003/027266
(87)国際公開日　平成15年4月3日(2003.4.3)
(31)優先権主張番号　60/325,534
(32)優先日　平成13年9月26日(2001.9.26)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　503300384
レオジーン・ホールディングス，インコーポレーテッド
アメリカ合衆国ペンシルバニア州１９４０３，ノリスタウン，アイゼンハウアー・アベニュー・２６５０
(74)代理人　100073139
弁理士　千田　稔
(74)代理人　100112586
弁理士　橋本　幸治
(72)発明者　チャン，チアンチョン
アメリカ合衆国ペンシルバニア州１９５４５，ノース・ウェールズ，ローアー・ステート・ロード，ナンバー・２４－シー－２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】コナジラミエクジソン受容体核酸、ポリペプチド、およびそれらの使用

(57)【要約】
本発明は、新規の単離コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドに関する。本発明はさらに、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードする核酸、それらを含むベクター、ならびに特にエクジソン受容体に基づく遺伝子発現変調系において遺伝子発現を変調させる方法およびコナジラミエクジソン受容体活性を変調する分子を同定する方法におけるそれらの使用に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号：１、配列番号：１のヌクレオチド１０２～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド１０２～２５８、配列番号：１のヌクレオチド２５９～４５７、配列番号：１のヌクレオチド４５８～６７７、配列番号：１のヌクレオチド６７８～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド２５９～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド４５８～１３４９、および配列番号：１のヌクレオチド６４８～１３４９からなる群から選択された核酸配列を含む単離ポリヌクレオチド。
【請求項２】
配列番号：２、配列番号：２のアミノ酸１～５２、配列番号：２のアミノ酸５３～１１８、配列番号：２のアミノ酸１１９～１９２、配列番号：２のアミノ酸１９３～４１６、配列番号：２のアミノ酸５３～４１６、配列番号：２のアミノ酸１１９～４１６、および配列番号：２のアミノ酸１８３～４１６からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド。
【請求項３】
請求項１または２記載の単離ポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項４】
該単離ポリヌクレオチドは発現コンピテント宿主細胞内での該単離ポリヌクレオチドの発現を許容する発現制御配列と機能的に連結している請求項３記載のベクター。
【請求項５】
該発現制御配列は哺乳動物細胞内で機能的であるプロモーターを含む請求項４記載のベクター。
【請求項６】
該ベクターはＲＮＡ分子、プラスミド、およびウイルスベクターからなる群から選択される請求項４記載のベクター。
【請求項７】
該ベクターはプラスミドである請求項６記載のベクター。
【請求項８】
請求項３記載のベクターを用いてトランスフェクトされた単離宿主細胞。
【請求項９】
該宿主細胞は、細菌細胞、真菌細胞、酵母細胞、線虫細胞、昆虫細胞、魚細胞、植物細胞、鳥細胞、動物細胞、および哺乳動物細胞からなる群から選択される請求項８記載の単離宿主細胞。
【請求項１０】
配列番号：２、配列番号：２のアミノ酸１～５２、配列番号：２のアミノ酸５３～１１８、配列番号：２のアミノ酸１１９～１９２、配列番号：２のアミノ酸１９３～４１６、配列番号：２のアミノ酸５３～４１６、配列番号：２のアミノ酸１１９～４１６、および配列番号：２のアミノ酸１８３～４１６からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。
【請求項１１】
コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドを生成するための方法であって：
ａ）コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドの発現を許容する条件下で培地中の請求項８記載の宿主細胞を培養するステップと；および
ｂ）該培地から該コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドを単離するステップと、を含む方法。
【請求項１２】
請求項１０の単離ポリペプチドに特異的に結合する抗体。
【請求項１３】
該抗体はモノクローナル抗体である請求項１２記載の抗体。
【請求項１４】

請求項１または２記載の単離ポリヌクレオチドおよび許容される担体を含む組成物。
【請求項１５】
請求項３記載のベクターおよび許容される担体を含む組成物。
【請求項１６】
請求項１０記載の単離ポリペプチドおよび許容される担体を含む組成物。
【請求項１７】
細胞内のコナジラミエクジソン受容体活性を変調する分子についてスクリーニングする方法であって：
（ａ）請求項１０に記載の単離ポリペプチドを含む細胞を候補分子と接触させるステップと；および
（ｂ）該分子の存在下でコナジラミエクジソン受容体活性を検出するステップと、を含む方法。
【請求項１８】
該分子がコナジラミエクジソン受容体のアゴニストである請求項１７記載の方法。
【請求項１９】
該分子がコナジラミエクジソン受容体のアンタゴニストである請求項１７記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、バイオテクノロジーの分野に関する。詳細には、本発明は、単離核酸、それらを含むベクター、およびそれらによってコードされるポリペプチド、ならびに遺伝子発現および殺虫剤発見の分野におけるそれらの使用に関する。より詳細には、本発明は同翅目コナジラミ（Ｂａｍｅｃｉａ ａｒｇｅｎｔｉｆｏｌｉ，「ＢａＥｃＲ」）からのエクジソン受容体ポリペプチドをコードする新規核酸、ならびにＢａＥｃＲを使用して宿主細胞内の遺伝子発現を変調する方法およびＢａＥｃＲの活性を変調する分子を同定する方法におけるその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
ここでは様々な出版物について言及するが、それらの開示はその全体が参照して組み込まれる。しかし、ここでの参考文献についての言及は、そのような参考文献を本出願に対する「先行技術」として利用できると承認したものと解釈すべきではない。
【０００３】
農業は、世界中の食料生産の効率を大きく増加させてきた。しかし、様々な害虫は彼らに有利なように餌の栽培源を探し出して利用するのが好都合であることに気付いている。これらの害虫は、典型的にはそれらの目に特徴的な時間的事象順序にしたがって発達する。多くの昆虫は、最初は毛虫もしくは蛆虫様の幼生形で発達する。その後、彼らは著しい変態を経験し、そこから独特の解剖学的特徴を有する成体が出現する。解剖学的類似性は、これらの生物が共有する発生学的、生理学的および生化学的類似性の反映である。特別には、Ａｓｈｂｕｒｎｅｒら（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．３８：６５５－６６２，１９７４）によって記載されたような昆虫エクジステロイドホルモン受容体および発達の原理は、おそらく多数の様々なタイプの昆虫が共有しているであろう。
【０００４】
昆虫による農作物の破壊を防止もしくは減少させるためには、昆虫集団を排除または減少させる目的で殺虫剤特性を備える有機分子が一般に使用されている。しかし、一部にはそれらが広範囲の活性を有して特異性が欠如するため、そして一部にはこれらの殺虫剤には生物易分解性ではないものがあるという事実のため、これらの殺虫剤の生態学的副作用は昆虫と他の動物種の両方の集団に重大な影響を及ぼす。これらの生物の一部は、生態学的またはその他の観点から有益なことがある。さらに、昆虫集団は適用される殺虫剤の作用を最小限に抑える方向に進化するので、適用される殺虫剤の量はたいてい、殺虫剤の適用

によって直接的または間接的な影響を受けるヒトを含む他の動物に重大な作用を引き起こすほど高度に増加させられる。そこで、殺虫剤が標的とする動物種にのみ生物学的作用を有し、そして生物分解性である高度に特異的な殺虫剤または高度に活性な殺虫剤のどちらに対しても重要な必要が存在する。エクジステロイドと同様に、ステロイド受容体スーパーファミリーの昆虫メンバーと複合することによって作用し、昆虫の発達を制御する新規昆虫ホルモンは、これらの望ましい特性を備える殺虫剤の有望な候補である。

【０００５】

昆虫の成長、脱皮、および発達は、エクジソンステロイドホルモン（脱皮ホルモン）および幼若ホルモンによって調節される（Ｄｈａｄｉａｌｌａら，１９９８，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｅｎｔｏｍｏｌ．４３：５４５－５６９）。昆虫におけるエクジソンに対する分子標的は、少なくともエクジソン受容体（ＥｃＲ）およびウルトラスピラクルタンパク質（ＵＳＰ）から構成される。ＥｃＲはシグネチャーＤＮＡおよびリガンド結合ドメインならびに活性化ドメインを特徴とする核ステロイド受容体スーパーファミリーのメンバーである（Ｋｏｅｌｌｅら，１９９１，Ｃｅｌｌ，６７：５９－７７）。ＥｃＲ受容体は、ポナステロンＡおよびムリステロンＡのような多数のステロイド化合物に応答性である。近年、市販で入手できる殺虫剤であるテブフェノジドおよびメトキシフェノジドを含む、エクジステロイドアゴニスト活性を備える非ステロイド化合物について記載されている（国際特許出願第ＰＣＴ／ＥＰ９６／００６８６号および米国特許第５，５３０，０２８号を参照）。どちらのアナログも他の生物にとって特別に優れた安全プロフィールを有する。

【０００６】

エクジソン受容体をコードするポリヌクレオチドは、全部が節足動物綱に含まれる双翅目（米国特許第５，５１４，５７８号および米国特許出願第６，２４５，５３１号Ｂ１）、鱗翅目、直翅目、半翅目、および１同翅目のアブラムシを含む様々な昆虫種からクローン化されている。特別には、ＥｃＲはハマキガ科のガの幼虫であるＣｈｏｒｉｓｔｏｎｅｕｒａ ｆｕｍｉｆｅｒａｎａ ＥｃＲ（「ＣｆＥｃＲ」；Ｋｏｔｈａｐａｌｌｉら，１９９５ Ｄｅｖ Ｇｅｎｅｔ．１７：３１９－３０）、ゴミムシダマシの幼虫のＴｅｎｅｂｒｉｏ ｍｏｌｉｔｏｒ ＥｃＲ（「ＴｍＥｃＲ」；Ｍｏｕｉｌｌｅｔら，１９９７，Ｅｕｒ．Ｊ．ｂｉｏｃｈｅｍ．２４８：８５６－８６３）、スズメガの１種の幼虫のＭａｎｄｕｃａ ｓｅｘｔａ ＥｃＲ（「ＭｓＥｃＲ」；Ｆｕｊｉｗａｒａら，１９９５，Ｉｎｓｅｃｔ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２５，８４５－８５６）、タバコガの幼虫のＨｅｌｉｏｔｈｉｅｓ ｖｉｒｅｓｃｅｎｓ ＥｃＲ（「ＨｖＥｃＲ」；Ｍａｒｔｉｎｅｚら，１９９９，Ｉｎｓｅｃｔ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２９：９１５－３０）、ユスリカの幼虫のＣｈｉｒｏｎｏｍｕｓ ｔｅｎｔａｎｓ ＥｃＲ（「ＣｔＥｃＲ」；Ｉｍｈｏｆら，１９９３，Ｉｎｓｅｃｔ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２３，１１５－１２４）、カイコガの幼虫のＢｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ ＥｃＲ（「ＢｍＥｃＲ」；Ｓｗｅｖｅｒｓら，１９９５，Ｉｎｓｅｃｔ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２５，８５７－８６６）、ｓｑｕｉｎｔｉｎｇ ｂｕｓｈ ｂｒｏｗｎのＢｉｃｙｃｌｕｓ ａｎｙｎａｎａ ＥｃＲ（「ＢａｎＥｃＲ」）、トチノキのＪｕｎｏｎｉａ ｃｏｅｎｉａ ＥｃＲ（「ＪｃＥｃＲ」）、ショウジョウバエのＤｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ ＥｃＲ（「ＤｍＥｃＲ」；Ｋｏｅｌｌｅら，１９９１，Ｃｅｌｌ ６７，５９－７７）、ネッタイシマカのＡｅｄｅｓ ａｅｇｙｐｔｉ ＥｃＲ（「ＡａＥｃＲ」；Ｃｈｏら，１９９５，Ｉｎｓｅｃｔ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２５，１９－２７）、クロバエのＬｕｃｉｌｉａ ｃａｐｉｔａｔａ（「ＬｃＥｃＲ」）、ヒツジクロバエのＬｕｃｉｌｉａ ｃｕｐｒｉｎａ ＥｃＲ（「ＬｕｃＥｃＲ」；Ｈａｎｎａｎ ａｎｄ Ｈｉｌｌ，１９９７，Ｉｎｓｅｃｔ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２７，４７９－４８８）、クロバエのＣａｌｌｉｐｈｏｒａ ｖｉｃｉｎｉａ ＥｃＲ（「ＣｖＥｃＲ」）、チチュウカイミバエのＣｅｒａｔｉｔｉｓ ｃａｐｉｔａｔａ ＥｃＲ（「ＣｃＥｃＲ」；Ｖｅｒｒａｓら，１９９９，Ｅ

ｕｒ Ｊ Ｂｉｏｃｈｅｍ. ２６５：７９８－８０８）、バッタのＬｏｃｕｓｔａ ｍｉｇｒａｔｏｒｉａ ＥｃＲ（「ＬｍＥｃＲ」；Ｓａｌｅｈら, １９９８, Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ. １４３：９１－９）、アブラムシのＭｙｚｕｓ ｐｅｒｓｉｃａｅ ＥｃＲ（「ＭｐＥｃＲ」；国際特許出願公開第ＷＯ９９／３６５２０号）、シオマネキのＣｅｌｕｃａ ｐｕｇｉｌａｔｏｒ ＥｃＲ（「ＣｐＥｃＲ」；Ｃｈｕｎｇら, １９９８, Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ １３９：２０９－２７）およびマダニのＡｍｂｌｙｏｍｍａ ａｍｅｒｉｃａｎｕｍ ＥｃＲ（「ＡｍａＥｃＲ」；Ｇｕｏら, １９９７, Ｉｎｓｅｃｔ Ｂｉｏｃｈｅｍ. Ｍｏｌｅｃ. Ｂｉｏｌ. ２７：９４５－９６２）からクローン化されている。これらのエクジソン受容体のヌクレオチドおよび／またはアミノ酸配列は決定されており、公的に入手できる。

【０００７】

エクジソン受容体複合体は、典型的には核受容体スーパーファミリーのメンバーであるタンパク質を含んでおり、このとき全メンバーは一般にアミノ末端トランス活性化ドメイン、ＤＮＡ結合ドメイン（「ＤＢＤ」）、およびヒンジ領域によってＤＢＤから分離されたリガンド結合ドメイン（「ＬＢＤ」）の存在を特徴とする。ここで使用する用語「ＤＮＡ結合ドメイン」は、ＤＮＡ結合ドメインが特定応答エレメントと結合するように機能する限り、ＤＮＡ結合タンパク質の全長に至るまでのＤＮＡ結合タンパク質の最小ポリペプチド配列を含む。核受容体スーパーファミリーのメンバーは、さらにまた４もしくは５つのドメイン；Ａ／Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、および一部のメンバーではＦの存在を特徴とする（米国特許第４，９８１，７８４号およびＥｖａｎｓ, Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：８８９－８９５（１９８８）を参照）。「Ａ／Ｂ」ドメインはトランス活性化ドメインに対応し、「Ｃ」はＤＮＡ結合ドメインに対応し、「Ｄ」はヒンジ領域に対応し、そして「Ｅ」はリガンド結合ドメインに対応する。このファミリーの一部のメンバーは、さらにまたＬＢＤのカルボキシ末端部位上で「Ｆ」に対応する別のトランス活性化ドメインを有することがある。

【０００８】

ＤＢＤは、それらの間の２つのアミノ酸モチーフであるＰ－ｂｏｘおよびＤ－ｂｏｘの２つのシステイン亜鉛フィンガーの存在を特徴とするが、それらはエクジソン応答エレメントに対する特異性を付与する。これらのドメインは、非相同受容体タンパク質の様々なドメインの天然、修飾、またはキメラであってよい。ＥｃＲ受容体は、ステロイド受容体ファミリーのサブセットと同様に、さらにヘテロダイマー化特性に対して応答性である、余り明確には定義されていない領域も有する。核受容体のドメインは本質的にモジュール式であり、ＬＢＤ、ＤＢＤ、およびトランス活性化ドメインは相互交換することができる。

【０００９】

エクジソン受容体複合体からの構成要素を組み込んでいる遺伝子スイッチ系は知られている。しかし、これらの既知の系では、ＥｃＲが使用される場合は常に、ＥｃＲは同一分子上の天然もしくは修飾ＤＮＡ結合ドメインおよびトランス活性化ドメインと結び付いている。ＵＳＰもしくはＲＸＲは典型的にはサイレントパートナーとして使用される。本出願人らは以前に、ＤＮＡ結合ドメインおよびトランス活性化ドメインが同一分子上にある場合はリガンドの不在下でのバックグラウンド活性が高いが、ＤＮＡ結合ドメインおよびトランス活性化ドメインが相違する分子上、すなわちヘテロダイマーまたはホモダイマー複合体の２つのパートナー各々の上に存在する場合にはそのような活性が劇的に低下することを証明した（第ＰＣＴ／ＵＳ０１／０９０５０号を参照）。

【００１０】

昆虫エクジソン受容体（ＥｃＲ）は、哺乳動物ＲＸＲの昆虫ホモログであるウルトラスピラクル（ＵＳＰ）とともにヘテロダイマー化し、そしてエクジステロイドとエクジソン受容体応答エレメントとを結合させ、エクジソン応答遺伝子の転写を活性化する（Ｒｉｄｄｉｆｏｒｄら, ２０００, Ｖｉｔａｍ Ｈｏｒｍ, ６０：１－７３）。ＥｃＲ／ＵＳＰ／リガンド複合体は、昆虫の発達および生殖中に重要な役割を果たす。ＥｃＲはステロイドホルモン受容体スーパーファミリーのメンバーであり、Ａ／Ｂ（トランス活性化）、

Ｃ（ＤＮＡ結合、ヘテロダイマー化）、Ｄ（ヒンジ、ヘテロダイマー化）、Ｅ（リガンド結合、ヘテロダイマー化およびトランス活性化）および一部の場合にはＦ（トランス活性化）ドメインの５つのモジュラードメインを有する。Ａ／Ｂ、ＣおよびＣのようなこれらのドメインの一部は、他のタンパク質に融合したときにそれらの機能を保持している。

【００１１】

近年、エクジソン受容体に基づく遺伝子発現系は開発されている。厳密に調節された誘導性遺伝子発現系もしくは「遺伝子スイッチ」は、例えば遺伝子療法、細胞内タンパク質の大規模生産、細胞に基づく高スループット・スクリーニングアッセイ、機能的ゲノミックスならびにトランスジェニック植物および動物における形質の調節のような様々な用途にとって有用である。米国特許出願第６，２６５，１７３号Ｂ１は、受容体のステロイド／甲状腺スーパーファミリーの様々なメンバーは、遺伝子発現系において使用するためにキイロショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）ウルトラスピラクル受容体（ＵＳＰ）または少なくともＵＳＰのダイマー化ドメインを含むそのフラグメントと結合できることを開示している。米国特許第５，８８０，３３３号は、トランス活性化ドメインとＤＮＡ結合ドメインが２つの相違するハイブリッドタンパク質上に配置されている植物で使用されるキイロショウジョウバエＥｃＲおよびウルトラスピラクル（ＵＳＰ）ヘテロダイマー系を開示している。

【００１２】

ＥｃＲに基づく遺伝子スイッチの第１バージョンはキイロショウジョウバエＥｃＲおよびハツカネズミ（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）ＲＸＲ（ＭｍＲＸＲ）を使用しており、これらの受容体が哺乳動物細胞系およびトランスジェニックマウスにおいてステロイドのポナステロンＡの存在下で、トランス活性化レポーター遺伝子を発現することを証明した（Ｃｈｒｉｓｔｏｐｈｅｒｓｏｎら，１９９２，ＰＮＡＳ ８９：６３１４－６３１８；Ｎｏら，１９９６，ＰＮＡＳ ９３：３３４６－３３５１）。この後に、Ｓｕｈｒら（１９９８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９５：７９９９－８００４）は、非ステロイドエクジソンアゴニストであるテブフェノジドは外因性ヘテロダイマーパートナーの不在下でＢｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ　ＥｃＲ（ＢｍＥｃＲ）を介して哺乳動物細胞内でレポーター遺伝子の高レベルのトランス活性化を誘導することを証明した。

【００１３】

国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ９７／０５３３０（第ＷＯ９７／３８１１７）号および第ＰＣＴ／ＵＳ９９／０８３８１（ＷＯ９９／５８１５５）号は、外因性遺伝子およびエクジソン応答エレメントを含むＤＮＡ構築物が、そのためのリガンドの存在下で、そして場合によってサイレントパートナーとして機能することのできる受容体の存在下でエクジソン応答エレメントに結合して遺伝子発現を誘導するエクジソン受容体を含む第２ＤＮＡ構築物によって活性化される外因性遺伝子の発現を変調する方法を開示している。最適なエクジソン受容体はキイロショウジョウバエから単離された。典型的には、このような系は最適な活性化を提供するためにサイレントパートナー、好ましくはレチノイドＸ受容体（ＲＸＲ）の存在を必要とする。哺乳動物細胞内では、昆虫エクジソン受容体（ＥｃＲ）はレチノイドＸ受容体（ＲＸＲ）とともにヘテロダイマー化し、リガンド依存性方法で標的遺伝子の発現を調節する。国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ９８／１４２１５（ＷＯ９９／０２６８３）号は、カイコガＢｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉから単離されたエクジソン受容体が外因性ダイマーパートナーを必要とせずに哺乳動物系において機能的であることを開示している。

【００１４】

あいにくなことに、これらのＵＳＰに基づく系は動物細胞内で構成性であるので、このためレポーター遺伝子発現を調節するためには有効ではない。上述のＥｃＲに基づく遺伝子調節系の欠点には、リガンドの不在下での相当に大きなバックグラウンド活性ならびに植物および動物両方において使用するためのこれらの系の不適合性が含まれる（米国特許第５，８８０，３３３号を参照）。

【００１５】
近年、トランス活性化およびＤＮＡ結合ドメインがそれらを２つの相違するタンパク質上に置くことによって相互から分離され、リガンドの不在下ではバックグラウンド活性を大きく低下させ、そしてリガンドの存在下ではバックグラウンドに比較して活性を大きく上昇させる、改良されたエクジソン受容体に基づく誘導性遺伝子発現系が開発されてきた（参照してその全体がここに組み込まれる係属特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ０１／０９０５０号）。このツーハイブリッド系は、特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ９７／０５３３０号および第ＰＣＴ／ＵＳ９８／１４２１５号に開示された２つの系と比較して大きく改良された誘導性遺伝子発現変調系である。このツーハイブリッド系は、ＤＮＡ結合ドメインがその遺伝子上のＤＮＡ結合部位へ結合したときにトランス活性化ドメインがプロモーターをより効果的に活性化するように、相互作用タンパク質の対が転写活性化ドメインをＤＮＡ結合ドメインに対してより好ましい位置へ持ち込む能力を利用する（例えば、米国特許第５，２８３，１７３号を参照）。手短には、ツーハイブリッド遺伝子発現系は２つの遺伝子発現カセットを含む：第１は核受容体ポリペプチドに融合したＤＮＡ結合ドメインをコードする、そして第２は相違する核受容体ポリペプチドに融合したトランス活性化ドメインをコードする。リガンドの存在下では、第１ポリペプチドと第２ポリペプチドとの相互作用は、ＤＮＡ結合ドメインをトランス活性化ドメインへ効果的に取り付ける。ＤＮＡ結合ドメインおよびトランス活性化ドメインは２つの相違する分子上に存在するので、リガンドの不在下ではバックグラウンド活性は大きく減少する。

【００１６】
ツーハイブリッド系はさらにまた、例えばポナステロンＡ（「ＰｏｎＡ」）またはムリステロンＡ（「ＭｕｒＡ」）のようなステロイドリガンドと比較した場合に、例えばジアシルヒドラジンのような非ステロイドリガンドに対する改良された感受性を提供する。すなわち、ステロイドと比較すると、非ステロイドリガンドは低濃度でより高度の活性を提供する。さらに、ＥｃＲ遺伝子スイッチに基づくトランス活性化は多くの場合細胞系依存性であるので、各適用のために最高トランス活性化能力を得るためにスイッチ系をより容易に仕立てることができる。さらに、ツーハイブリッド系は非修飾ＲＸＲをスイッチパートナーとして使用したときに頻回に発生するＲＸＲの過剰発現に起因する一部の副作用を回避する。好ましいツーハイブリッド系では、ＥｃＲもしくはＲＸＲの天然ＤＮＡ結合およびトランス活性化ドメインは排除され、その結果としてこれらのハイブリッド分子は細胞内に存在する他のステロイドホルモン受容体と相互作用する機会が減少し、その結果として副作用が減少する。

【００１７】
本出願人らは今では、宿主細胞内での遺伝子発現を変調する方法およびコナジラミＥｃＲの活性を変調する分子を同定する方法において使用するためのコナジラミから追加の同翅目ＥｃＲポリヌクレオチドの全長コード配列を入手して決定した。ここで記載するように、本出願人らの発明は、宿主細胞中の組み換えタンパク質の高度に特異的調節のための遺伝子発現系の構成要素として有用な、または同翅目昆虫エクジソン受容体のアゴニストまたはアンタゴニストとして機能することのできる新規分子を同定するために有用な、新規コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドをコードする新規ポリヌクレオチドを提供する。

【００１８】
【特許文献１】
国際特許出願第ＰＣＴ／ＥＰ９６／００６８６号パンフレット
【特許文献２】
米国特許第５，５３０，０２８号明細書
【特許文献３】
米国特許第５，５１４，５７８号明細書
【特許文献４】
米国特許出願第６，２４５，５３１号Ｂ１明細書

【特許文献５】
国際特許出願公開第ＷＯ９９／３６５２０号パンフレット
【特許文献６】
米国特許第４，９８１，７８４号明細書
【特許文献７】
第ＰＣＴ／ＵＳ０１／０９０５０号パンフレット
【特許文献８】
米国特許出願第６，２６５，１７３号Ｂ１明細書
【特許文献９】
米国特許第５，８８０，３３３号明細書
【特許文献１０】
国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ９７／０５３３０（第ＷＯ９７／３８１１７）号パンフレット
【特許文献１１】
国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ９９／０８３８１（ＷＯ９９／５８１５５）号パンフレット
【特許文献１２】
国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ９８／１４２１５（ＷＯ９９／０２６８３）号パンフレット
【特許文献１３】
米国特許第５，２８３，１７３号
【非特許文献１】
Ａｓｈｂｕｒｎｅｒら、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．３８：６５５－６６２，１９７４
【非特許文献２】
Ｄｈａｄｉａｌｌａら，１９９８，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｅｎｔｏｍｏｌ．４３：５４５－５６９
【非特許文献３】
Ｋｏｅｌｌｅら，１９９１，Ｃｅｌｌ，６７：５９－７７
【非特許文献４】
Ｅｖａｎｓ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：８８９－８９５（１９８８）
【非特許文献５】
Ｒｉｄｄｉｆｏｒｄら，２０００，Ｖｉｔａｍ Ｈｏｒｍ，６０：１－７３
【非特許文献６】
Ｃｈｒｉｓｔｏｐｈｅｒｓｏｎら，１９９２，ＰＮＡＳ ８９：６３１４－６３１８；
【非特許文献７】
Ｎｏら，１９９６，ＰＮＡＳ ９３：３３４６－３３５１
【非特許文献８】
Ｓｕｈｒら、１９９８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９５：７９９９－８００４
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００１９】
本発明は、有益にも新規コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、宿主細胞内の当該ポリペプチドの遺伝子発現を調節する方法およびコナジラミＥｃＲの活性を変調する新規分子を同定する際に有用である。
【課題を解決するための手段】
【００２０】
本発明の様々な態様については、本発明の核酸、ポリペプチド、ベクター、抗体、組成物および使用方法に目を向けて、以下のセクションで極めて詳細に説明する。様々なセクシ

ョンに分けて体系化したのは、本発明についての理解を容易にすることを意図したもので、決して本発明を限定することは意図していない。

【００２１】

用語の定義

以下に定義した用語は本明細書を通して使用されており、本発明の範囲および実践を理解する際に役立つはずである。

特定実施形態では、用語「約」もしくは「およそ」は、表示した数値もしくは範囲の２０％以内、好ましくは１０％以内、より好ましくは５％以内、およびいっそうより好ましくは１％以内を意味する。

【００２２】

用語「実質的に含まない」は、「Ａ」（「Ａ」が単一タンパク質、ＤＮＡ分子、ベクター、組み換え宿主細胞等である場合）が、組成物中のタンパク質、ＤＮＡ、ベクター（ＡおよびＢに属する種のカテゴリーに依存して）の重量で少なくとも約７５％が「Ａ」であるときに、実質的に「Ｂ」（「Ｂ」が１つ以上の汚染タンパク質、ＤＮＡ分子、ベクター等を含む場合）を含まないことを意味する。好ましくは、「Ａ」は組成物中にＡ＋Ｂ種を重量で少なくとも約９０％、最も好ましくは重量で少なくとも約９９％を含む。さらにまた、実質的に汚染物を含まない組成物は当該種の活性または特徴を有する単一分子量種しか含有していないのが好ましい。

【００２３】

本発明の目的での用語「単離（された）」は、生物学的物質（核酸またはタンパク質）がその本来の環境（それが自然に存在する環境）から取出されていることを表している。例えば、植物または動物において自然状態で存在するポリヌクレオチドは単離されていないが、それがその中に自然に存在する隣接核酸から分離された同一ポリヌクレオチドは「単離（された）」と見なされる。用語「精製（された）」は、他の化合物の存在を除いて、物質が絶対的純粋さを示す形状で存在することを必要としない。それはむしろ相対的定義である。

【００２４】

ポリヌクレオチドは、少なくとも１オーダー、好ましくは２もしくは３オーダー、および好ましくは４もしくは５オーダーまで出発物質または天然物質が精製された後には「精製」状態にある。

【００２５】

ここで使用する用語「実質的純粋」は、その天然汚染物から分離されているポリペプチドもしくはその他の物質を説明する。典型的には、モノマーポリペプチドは、サンプルの少なくとも約６０～７５％が単一ポリペプチドバックボーンを示す場合に実質的純粋である。典型的には同一ポリペプチド配列は小さな変異体もしくは化学修飾を共有する。通常は、実質的純粋ポリペプチドは約８５超～９０％のポリペプチドサンプルを含んでおり、そして好ましくは約９９％超純粋であろう。通常は、純度は染色により均質性を決定されるとともに、ポリアクリルアミドゲル上で測定される。あるいはまた、一定の目的では高分解能が必要になり、そして精製のためのＨＰＬＣまたは類似手段が使用されるであろう。ほとんどの目的には、純度を決定するためには単純なクロマトグラフィーカラムまたはポリアクリルアミドゲルが使用されるであろう。

【００２６】

用語「天然で関連する宿主細胞成分を実質的に含まない」とは、その天然宿主細胞状態でそれに付随する天然汚染物から分離されているポリペプチドもしくはその他の物質を説明する。そこで、化学合成またはそれが自然に由来する宿主細胞とは相違する細胞系中で合成されているポリペプチドは、その天然で関連する宿主細胞成分を含まないであろう。

【００２７】

用語「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、ここでヌクレオチドと呼ばれる共有結合サブユニットを含んでなるポリマー化合物を意味するために交換可能に使用する。核酸には、ポリリボ核酸（ＲＮＡ）およびポリデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）が含まれるが、それら

はどちらも一本鎖であっても二本鎖であってもよい。ＤＮＡにはｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、合成ＤＮＡ、および半合成ＤＮＡが含まれるが、それらに限定されない。ＤＮＡは線状、環状、または超らせん状であってよい。

【００２８】

「核酸分子」は、一本鎖形または二本鎖ヘリックスのいずれかでの、リボヌクレオシド（アデノシン、グアノシン、ウリジンもしくはシチジン；「ＲＮＡ分子」）またはデオキシリボヌクレオシド（デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、もしくはデオキシシチジン；「ＤＮＡ分子」）、または例えばホスホロチオエートおよびチオエステルのようなそれらのいずれかのホスホエステルアナログのホスフェートエステルポリマー形を意味する。二本鎖ＤＮＡ－ＤＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡおよびＲＮＡ－ＲＮＡヘリックスが考えられる。用語「核酸分子」、および特に「ＤＮＡもしくはＲＮＡ分子」は、該分子の一次および二次構造だけを意味しており、そしていずれか特定の三次形態へは限定されていない。そこで、この用語には、特に線状もしくは環状ＤＮＡ分子（例、制限フラグメント）、プラスミド、および染色体中で見いだされる二本鎖ＤＮＡが含まれる。特定の二本鎖ＤＮＡ分子の構造を検討する際には、配列はＤＮＡの非転写鎖（すなわち、ｍＲＮＡと相同である配列を有する鎖）に沿って５’～３’方向における配列だけを提供する正規規則にしたがって記載されうる。「組み換えＤＮＡ分子」は、分子生物学的操作を受けたＤＮＡ分子である。

【００２９】

用語「フラグメント」は、標準核酸と比較して長さが短く、そして共通部分にわたって標準核酸と同一のヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を意味すると理解されるであろう。このような本発明による核酸フラグメントは、適切な場合はそれが構成成分であるより大きなポリヌクレオチド内に含まれていてよい。このようなフラグメントは、本発明による核酸の少なくとも６～１１００連続ヌクレオチドの範囲内の長さのオリゴヌクレオチドを含む、またはそれらからなる。

【００３０】

ここで使用する「単離核酸フラグメント」とは、一本鎖または二本鎖の、場合によっては合成、非天然もしくは改変ヌクレオチド塩基を含有するＲＮＡもしくはＤＮＡのポリマーである。ＤＮＡのポリマー形における単離核酸フラグメントはｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡもしくは合成ＤＮＡの１つ以上のセグメントから構成されてよい。

【００３１】

「遺伝子」とは、ポリペプチドをコードするヌクレオチドのアッセンブリーを意味しており、そしてｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡ核酸を含む。「遺伝子」とは、さらにまたコード配列に先行する（５’非コード配列）および続く（３’非コード配列）調節配列を含む特定タンパク質もしくはポリペプチドを発現する核酸フラグメントを意味する。「天然遺伝子」とは、自然に見いだされる固有の調節配列を備える遺伝子を意味する。「キメラ遺伝子」とは、自然には一緒に見いだされない調節および／またはコード配列を含む、天然遺伝子ではないいずれかの遺伝子を意味する。したがって、キメラ遺伝子は相違する起源に由来する調節配列およびコード配列、または同一起源に由来するが自然に見いだされるのとは相違する方法で配列されている調節配列およびコード配列を含んでいてよい。キメラ遺伝子は、相違する起源に由来するコード配列および／または相違する起源に由来する調節配列を含んでいてよい。「内因性遺伝子」とは、生物のゲノム内におけるその自然位置にある天然遺伝子を意味する。「「外来」遺伝子もしくは「非相同」遺伝子とは、通常は該宿主生物において見いだされないが、遺伝子導入によって宿主生物内に導入されている遺伝子を意味する。外来遺伝子は、非自然生物内へ挿入された天然遺伝子、またはキメラ遺伝子を含むことができる。「導入遺伝子」は、形質転換方法によってゲノム内に導入されている遺伝子である。

【００３２】

「非相同」ＤＮＡとは、自然には細胞内、または細胞の染色体部位内に位置しないＤＮＡを意味する。好ましくは、非相同ＤＮＡには該細胞に対する外来の遺伝子が含まれる。

【００３３】
用語「ゲノム」には染色体、ならびにミトコンドリア、葉緑体およびウイルスＤＮＡまたはＲＮＡが含まれる。
【００３４】
核酸分子は、該核酸分子の一本鎖形が温度および溶液イオン強度に関する適切な条件下で他の核酸分子へアニーリングできる場合には、例えばｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、またはＲＮＡのような他の核酸分子に「ハイブリダイズすることができる」（Ｓａｍｂｒｏｏｋら，１９８９，下記を参照）。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件はよく知られており、Ｓａｍｂｒｏｏｋ Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ Ｅ．Ｆ．ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．，「分子クローニング：実験マニュアル第２版（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ）」，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ（１９８９）の特に第１１章および表１１．１に例示されている（その全体が参照してここに組み込まれる）。温度およびイオン強度の条件がハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決定する。
【００３５】
ストリンジェンシー条件は、例えば遠縁に当たる生物からの相同配列のような中等度に類似するフラグメントから近縁生物からの機能性酵素を複製する遺伝子のような高度に類似する遺伝子についてスクリーニングするために調整できる。相同核酸についての予備スクリーニングのためには、例えば５×ＳＳＣ、０．１％ ＳＤＳ、０．２５％ミルク、およびホルムアミドなし；または３０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ、０．５％ ＳＤＳのような５５℃のＴｍに対応する低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件を使用できる。中ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、例えば５×もしくは６×ＳＳＣとともに４０％ホルムアミドのようなより高いＴｍに対応する。高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、例えば５０％ホルムアミド、５×もしくは６×ＳＣＣのような最高Ｔｍに対応する。
【００３６】
ハイブリダイゼーションには、２つの核酸が相補的配列を含有することが必要であるが、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに依存して、塩基間のミスマッチも可能である。用語「相補的」は、相互にハイブリダイズすることのできるヌクレオチド塩基間の関係を説明するために使用される。例えば、ＤＮＡに関して、アデノシンはチミンに相補的であり、シトシンはグアニンに相補的である。したがって、本発明にはここに開示した、または使用した完全配列に相補的である単離核酸フラグメントならびにそれらの実質的に類似の核酸配列が含まれる。
【００３７】
本発明の特定実施形態では、ポリヌクレオチドは５５℃のＴｍでのハイブリダイゼーションステップを含むハイブリダイゼーション条件を使用する、そして上述に記載した条件を利用することによって検出される。好ましい実施形態ではＴｍは、６０℃である；より好ましい実施形態では、Ｔｍは６３℃である；さらにいっそうより好ましい実施形態では、Ｔｍは６５℃である。
【００３８】
ハイブリダイゼーション後の洗浄もまたストリンジェンシー条件を決定する。１組の好ましい条件は、室温で１５分間（ｍｉｎ）かけて６×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳで開始し、その後４５℃で３０分間かけて２×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳで繰り返し、さらに５０℃で３０分間かけて０．２×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳにより２回繰り返す一連の洗浄を使用する。より好ましい１組のストリンジェンシー条件は、より高温を使用するが、その場合の洗浄は０．２×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳ中での最終２回の３０分間の洗浄の温度を６０℃へ上昇させたこと以外は上述と同一である。また別の１組の好ましい高ストリンジェンシー条件は、６５℃での０．１×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中での最終２回の洗浄を使用する。
【００３９】

核酸をハイブリダイズするための適切なストリンジェンシーは、当技術分野において知られている変数である核酸の長さおよび相補性の程度に左右される。２つのヌクレオチド配列間の類似性または相同性の程度が大きいほど、それらの配列を有する核酸のハイブリッドに対するＴｍの価値が大きくなる。核酸ハイブリダイゼーションの相対安定度（より高いＴｍに対応する）は以下の順序で低下する：ＲＮＡ：ＲＮＡ、ＤＮＡ：ＲＮＡ、ＤＮＡ：ＤＮＡ。長さが１００ヌクレオチドを超えるハイブリッドに対して、Ｔｍを計算する方程式が引き出されている（Ｓａｍｂｒｏｏｋら，　上記参照，　９．５０～０．５１）。もっと短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーションのためには、ミスマッチの位置がより重要になり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する（Ｓａｍｂｒｏｏｋら，　上記参照，１１．７－１１．８）。

【００４０】

ハイブリダイゼーションの選択性は、特異性の完全欠如より選択的であるハイブリダイゼーションが発生する場合に存在する。典型的には、選択的ハイブリダイゼーションは、少なくとも約１４／２５ヌクレオチドの区間に渡って少なくとも約５５％、好ましくは少なくとも約６５％、より好ましくは少なくとも約７５％、および最も好ましくは少なくとも約９０％の相同性がある場合に発生する。参照してここに組み込まれるＫａｎｅｈｉｓａ，　Ｍ．（１９８４），　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．　１２：２０３－２１３を参照されたい。ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件には、典型的には約１Ｍ未満、より通常は約５００ｍＭ未満および好ましくは約２００ｍＭ未満の塩濃度が含まれる。温度条件は、典型的には２０℃超、より通常は約３０℃超、および好ましくは約３７℃を超えているであろう。特に塩基組成および相補的鎖のサイズ、有機溶媒の存在および塩基ミスマッチの程度を含む他の要素はハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに大きな影響を及ぼす可能性があるので、パラメーターの組み合わせはいずれか１つの絶対尺度より重要である。

【００４１】

本発明の特定実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは５００ｍＭ未満の塩および少なくとも３７℃でのハイブリダイゼーションステップ、および少なくとも６３℃での２×ＳＳＰＥ中での洗浄ステップを含むハイブリダイゼーション条件を使用することによって検出される。好ましい実施形態では、ハイブリダイゼーション条件はハイブリダイゼーションステップのために２００ｍＭ未満の塩および少なくとも３７℃を含む。より好ましい実施形態では、ハイブリダイゼーション条件はハイブリダイゼーションステップおよび洗浄ステップどちらについても２×ＳＳＰＥおよび６３℃を含む。

【００４２】

１つの実施形態では、ハイブリダイズ可能な核酸のための長さは少なくとも約１０ヌクレオチドである。ハイブリダイズ可能な核酸のための好ましい最小長さは、少なくとも約１５ヌクレオチドである；より好ましくは少なくとも約２０ヌクレオチドである；およびいっそうより好ましくはその長さは約３０ヌクレオチドである。さらに、当業者であれば温度および洗浄溶液塩濃度をプローブの長さのような要素によって必要に応じて調整できることを認識するであろう。

【００４３】

用語「プローブ」とは、二本鎖分子を形成するために相補的一本鎖標的核酸との塩基対を形成できる一本鎖核酸分子を意味する。

【００４４】

ここで使用する用語「オリゴヌクレオチド」とは、ゲノムＤＮＡ分子、ｃＤＮＡ分子、プラスミドＤＮＡまたはｍＲＮＡ分子へハイブリダイズ可能な、一般には少なくとも１８ヌクレオチドの核酸を意味する。オリゴヌクレオチドは、例えば^{32}Ｐヌクレオチドまたは例えばビオチンのような標識が共有結合されているヌクレオチドを用いて標識できる。標識されたオリゴヌクレオチドは、核酸の存在を検出するためのプローブとして使用できる。オリゴヌクレオチド（それらの一方または両方を標識できる）は、全長核酸もしくは核酸のフラグメントをクローニングするため、または核酸の存在を検出するためのどちらか

においてＰＣＲプライマーとして使用できる。オリゴヌクレオチドはさらにまたＤＮＡ分子との三重らせんを形成するために使用することもできる。一般に、オリゴヌクレオチドは、好ましくは核酸合成装置上で合成的に調製される。したがって、オリゴヌクレオチドはチオエステル結合等のような自然には発生しないホスホエステルアナログ結合を用いて調製できる。

【００４５】

「プライマー」は、適切な条件下でＤＮＡ合成のための開始点として機能できる二本鎖核酸領域を作製するために標的核酸配列へハイブリダイズするオリゴヌクレオチドである。このようなプライマーは、ポリメラーゼ連鎖反応において使用できる。

【００４６】

「ポリメラーゼ連鎖反応」はＰＣＲと略記され、特定核酸配列を酵素的に増幅させるためのインビトロ方法を意味する。ＰＣＲは標的分子の鎖を分離するためのテンプレート核酸の変性、一本鎖ＰＣＲオリゴヌクレオチドプライマーのテンプレート核酸へのアニーリング、およびＤＮＡポリメラーゼによるアニール化プライマーの伸長の３段階を含む各周期を備える反復した一連の温度サイクルを含む。ＰＣＲは、標的分子の存在を検出するための、および定量的もしくは判定量的条件下で核酸の出発プール内の標的分子の相対量を決定するための手段を提供する。

【００４７】

「逆転写ポリメラーゼ連鎖反応」は、ＲＴ－ＰＣＲと略記され、１つ以上のＲＮＡ分子から１つ以上の標的ｃＤＮＡ分子を酵素的に生成し、それに続いて上述のように１つ以上の標的ｃＤＮＡ分子内の１つ以上の特定核酸配列の酵素的増幅を実施するためのインビトロ方法を意味する。ＲＴ－ＰＣＲもまた、標的分子の存在を検出するための、および定量的もしくは半定量的条件下で核酸の出発プール内の標的分子の相対量を決定するための手段を提供する。

【００４８】

ＤＮＡ「コード配列」は、適切な調節配列の制御下に置かれると、インビトロもしくはインビボで細胞内で転写されてポリペプチドへ翻訳される二本鎖ＤＮＡ配列である。「適切な調節配列」は、コード配列の上流（５’非コード配列）、内部、または下流（３’非コード配列）に配置された、そして関連コード配列の転写、ＲＮＡプロセッシングもしくは安定性、または翻訳に影響を及ぼすヌクレオチド配列を意味する。調節配列は、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、ＲＮＡプロセッシング部位、エフェクター結合部位およびステムループ構造を含むことがある。コード配列の境界は、５’（アミノ）末端での開始コドンおよび３’（カルボキシル）末端での翻訳終止コドンによって決定される。コード配列には、原核生物配列、ｍＲＮＡからのｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ配列、および合成ＤＮＡ配列さえ含むことができるが、それらに限定されない。コード配列が真核細胞内での発現を目的とする場合は、ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列は通常はコード配列の３’に配置される。

【００４９】

「オープンリーディングフレーム」は、ＯＲＦと略記され、例えばＡＴＧもしくはＡＵＧのような翻訳開始シグナルもしくは開始コドン、および終結コドンを含み、ポリペプチド配列内に翻訳できる可能性があるＤＮＡ、ｃＤＮＡもしくはＲＮＡいずれかの核酸配列の長さを意味する。

【００５０】

用語「頭－頭」は、ここでは相互の関係において２つのポリヌクレオチド配列の方向を説明するために使用する。２つのポリヌクレオチドは、１つのポリヌクレオチドのコード鎖の５’端が他方のポリヌクレオチドのコード鎖の５’端に隣接しているときに頭－頭方向に配置されており、それにより各ポリヌクレオチドの転写の方向は他方のポリヌクレオチドの５’端から離れて進行する。用語「頭－頭」は（５’）－（５’）と略記することができ、さらにまた記号（←→）または（３’←５’５’→３’）と表示することもできる。

【００５１】
用語「尾－尾」は、ここでは相互の関係において２つのポリヌクレオチド配列の方向を説明するために使用する。２つのポリヌクレオチドは、１つのポリヌクレオチドのコード鎖の３’端が他方のポリヌクレオチドのコード鎖の３’端に隣接しているときに尾－尾方向に配置されており、それにより各ポリヌクレオチドの転写の方向は他方のポリヌクレオチドに向かって進行する。用語「尾－尾」は（３’）－（３’）と略記することができ、さらにまた記号（→←）または（５’→３’３’←５’）と表示することもできる。
【００５２】
用語「頭－尾」は、ここでは相互の関係において２つのポリヌクレオチド配列の方向を説明するために使用する。２つのポリヌクレオチドは、１つのポリヌクレオチドのコード鎖の５’端が他方のポリヌクレオチドのコード鎖の３’端に隣接しているときに頭－尾方向に配置されており、それにより各ポリヌクレオチドの転写の方向は他方のポリヌクレオチド方向と同一方向に進行する。用語「頭－尾」は（５’）－（３’）と略記することができ、さらにまた記号（→→）または（５’→３’５’→３’）と表示することもできる。
【００５３】
用語「下流」とは、参照ヌクレオチド配列に対する３’端に位置するヌクレオチド配列を意味する。特別には、下流ヌクレオチド配列は一般に転写の開始点に続く配列のことを述べている。例えば、遺伝子の転写開始コドンは転写の開始部位の下流に位置する。
【００５４】
用語「上流」とは、参照ヌクレオチド配列に対する５’端に位置するヌクレオチド配列を意味する。特別には、上流ヌクレオチド配列は一般にコード配列または転写の開始点の５’側に位置する配列のことを述べている。例えば、大多数のプロモーターは転写の開始部位の上流に位置する。
【００５５】
用語「制限エンドヌクレアーゼ」および「制限酵素」とは、二本鎖ＤＮＡ内の特定ヌクレオチド配列内で結合および切断する酵素を意味する。
【００５６】
「相同組み換え」とは、例えば染色体内へのベクターの挿入のような、外来ＤＮＡ配列を他のＤＮＡ分子内へ挿入することを意味する。好ましくは、ベクターは相同組換えのために特定染色体部位を標的とする。特定の相同組み換えのためには、ベクターは相補的結合および染色体内への取り込みを可能にするために、ベクターは染色体の配列に相同性である十分に長い領域を含む。相同性の領域が長いほど、そして配列類似性の程度が大きいほど、相同組み換えの有効性は増加する可能性がある。
【００５７】
本発明によるポリヌクレオチドを増殖させるためには、当技術分野において知られている数種の方法を使用できる。適切な宿主系および増殖条件が確立されると、組み換え発現ベクターを大量に増幅かつ調製することができる。ここで記載するように、使用できる発現ベクターには以下のベクターまたはそれらの誘導体が含まれるが、それらに限定されない：ほんの数例を挙げると、ワクシニアウイルスもしくはアデノウイルスのようなヒトもしくは動物ウイルス；バキュロウイルスのような昆虫ウイルス；酵母ベクター；バクテリオファージベクター（例、ラムダ）、およびプラスミドおよびコスミドＤＮＡベクター。
【００５８】
「ベクター」は、宿主細胞内へ核酸をクローニングする、および／または導入するための手段である。ベクターは、付着セグメントの複製を引き起こすことができるように、それに別のＤＮＡセグメントを付着させることのできるレプリコンであってよい。「レプリコン」は、インビボでＤＮＡ複製の自律ユニットとして機能する、すなわちその自己制御下で複製することのできるいずれかの遺伝要素（例、プラスミド、ファージ、コスミド、染色体、ウイルス）である。用語「ベクター」には、インビトロ、エックスビボまたはインビボで細胞内へ核酸を導入するためのウイルスおよび非ウイルス手段の両方が含まれる。当技術分野において知られている多数のベクターを使用すると、核酸を操作し、応答エレ

メントやプロモーターを遺伝子等内へ組み込むことができる。考えられるベクターには、例えばラムダ誘導体のようなバクテリオファージ、またはｐＢＲ３２２もしくはｐＵＣプラスミド誘導体のようなプラスミド、またはブルースクリプトベクターを含む例えばプラスミドもしくは修飾ウイルスが含まれる。例えば、応答エレメントおよびプロモーターに対応するＤＮＡフラグメントの適切なベクター内への挿入は、適切なＤＮＡフラグメントを相補的付着末端を有する選択されたベクター内へライゲートすることによって遂行できる。あるいはまた、ＤＮＡ分子の末端を酵素的に修飾できる、またはヌクレオチド配列（リンカー）をＤＮＡ末端内へライゲートすることによっていずれかの部位を生成することができる。このようなベクターは、細胞ゲノム内へマーカーを組み込んでいる細胞の選択を提供する選択可能なマーカー遺伝子を含有するように人工的に作り出されてよい。このようなマーカーは、マーカーによってコードされたタンパク質を組み込んで発現する宿主細胞の同定および／または選択を可能にする。

【００５９】

ウイルスベクター、および特別にはレトロウイルスベクターは、細胞、ならびに生きている動物対象中での極めて様々な遺伝子送達用途において使用されてきた。使用できるウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、ポックスウイルス、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、単純ヘルペスウイルス、エプスタイン－バーウイルス、アデノウイルス、ジェミニウイルスおよびカリモウイルスベクターが含まれるが、それらに限定されない。非ウイルスベクターには、プラスミド、リポソーム、帯電脂質（サイトフェクチン）、ＤＮＡタンパク質複合体、およびバイオポリマーが含まれる。核酸に加えて、ベクターはさらにまた核酸導入結果（導入先の組織、発現の期間等）の選択、測定および監視において有用である１つ以上の調節領域、および／または選択可能なマーカーも含むことができる。

【００６０】

用語「プラスミド」とは、多くの場合に細胞の中心代謝の一部ではない、および通常は環状二本鎖ＤＮＡ分子の形状にある遺伝子を有する染色体外エレメントを意味する。このようなエレメントは、多数のヌクレオチド配列が選択された遺伝子産物のためのプロモーターフラグメントおよびＤＮＡ配列を適切な３’未翻訳配列と一緒に細胞内へ導入することのできる独自構造内へ結合もしくは組み換えられている、いずれかの起源由来の一本鎖もしくは二本鎖ＤＮＡもしくはＲＮＡの線状、環状、もしくはスーパーコイル状の自己複製配列、ゲノム統合配列、ファージもしくはヌクレオチド配列であってよい。

【００６１】

「クローニングベクター」は、連続的に複製し、付着セグメントの複製を惹起するようにそれに他の核酸セグメントを付着させることのできるプラスミド、ファージもしくはコスミドのような複製起点を含む１ユニット長の核酸、好ましくはＤＮＡである「レプリコン」である。クローニングベクターは、１つの細胞タイプでの複製および他の細胞タイプでの発現をすることができる可能性がある（「シャトルベクター」）。

【００６２】

ベクターは、例えばトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、ＤＥＡＥデキストラン、リン酸カルシウム沈降、リポフェクション（リソソーム融合）、粒子衝撃、遺伝子銃の使用、またはＤＮＡベクタートランスポーターのような当技術分野において知られている方法によって所望の宿主細胞内へ導入することができる（例えばＷｕら，１９９２，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：９６３－９６７；Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ，１９８８，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６３：１４６２１－１４６２４；および１９９０年３月１５日に出願されたＨａｒｔｍｕｔらのカナダ国特許出願第２，０１２，３１１号等を参照）。

【００６３】

本発明によるポリヌクレオチドは、さらにまたリポフェクションによってインビボで導入することもできる。ここ１０年間に、インビトロで核酸をカプセル封入およびトランスフェクションするためのリポソームの使用が増加してきている。リポソーム媒介トランスフ

ェクションに伴って遭遇する困難や危険を制限するために設計された合成カチオン性脂質を使用すると、マーカーをコードする遺伝子をインビボでトランスフェクションするためのリポソームを調製することができる（Ｆｅｌｇｎｅｒら，１９８７，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８４：７４１３；Ｍａｃｋｅｙら，１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８５：８０２７－８０３１；およびＵｌｍｅｒら，１９９３，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５９：１７４５－１７４８）。カチオン性脂質を使用すると、負荷電核酸のカプセル封入を促進することができ、そしてさらに負荷電細胞膜との融合を促進することもできる（Ｆｅｌｇｎｅｒ ａｎｄ Ｒｉｎｇｏｌｄ，１９８９，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３７：３８７－３８８）。核酸を導入するために特に有用な脂質化合物および組成物は、国際特許出願第ＷＯ９５／１８８６３号および第ＷＯ９６／１７８２３号、ならびに米国特許第５，４５９，１２７号に記載されている。インビボで特定器官内に外因性遺伝子を導入するためのリポフェクションの使用にはある種の実用的利点がある。特定細胞へのリポソームの分子ターゲティングは、１つの有益な領域を表している。トランスフェクションを特定細胞タイプへ方向付けることが、膵臓、肝臓、腎臓、および脳のような細胞異質性を備える組織中で特に好ましいことは明白である。脂質は、ターゲティングのために他の分子へ化学結合させることができる（Ｍａｃｋｅｙら，１９８８，上記）。標的とされる例えばホルモンや神経伝達物資のようなペプチド、および例えば抗体のようなタンパク質、または非ペプチド分子はリポソームへ化学的に結合させることができよう。

【００６４】

例えばカチオン性オリゴペプチド（例、国際特許出願第ＷＯ９５／２１９３１号）、ＤＮＡ結合タンパク質由来のペプチド（例、国際特許出願第ＷＯ９６／２５５０８号）またはカチオン性ポリマー（例、国際特許出願第ＷＯ９５／２１９３１号）のような他の分子もまた、インビボでの核酸のトランスフェクションを容易にするために有用である。

【００６５】

そのままのＤＮＡプラスミドのようなベクターをインビボで導入することもまた可能である（米国特許第５，６９３，６２２号、第５，５８９，４６６号および第５，５８０，８５９号を参照）。受容体媒介性ＤＮＡ送達アプローチもまた使用できる（Ｃｕｒｉｅｌら，１９９２，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．３：１４７－１５４；およびＷｕ ａｎｄ Ｗｕ，１９８７，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２）。

【００６６】

用語「トランスフェクション」とは、細胞による外因性もしくは非相同ＲＮＡまたはＤＮＡの取り込みを意味する。細胞は、外因性もしくは非相同ＲＮＡまたはＤＮＡが細胞の内側に導入されている場合には、そのようなＲＮＡまたはＤＮＡによって「トランスフェクト」されている。細胞は、トランスフェクトされたＲＮＡまたはＤＮＡが表現型変化に影響を及ぼす場合に、外因性もしくは非相同ＲＮＡまたはＤＮＡによって「形質転換」されている。形質転換ＲＮＡまたはＤＮＡは、該細胞のゲノムを構成する染色体ＤＮＡ内へ統合（共有結合）させることができる。

【００６７】

「形質転換」とは、核酸フラグメントを宿主生物のゲノム内へ導入して遺伝的に安定性の遺伝形質を生じさせることを意味する。形質転換核酸フラグメントを含有する宿主生物は、「トランスジェニック」もしくは「組み換え」もしくは「形質転換」生物と呼ばれる。

【００６８】

用語「遺伝領域」とは、ポリペプチドをコードする遺伝子を含む核酸分子もしくはヌクレオチド配列の領域を意味する。

【００６９】

さらに、本発明によるポリヌクレオチドを含む組み換えベクターは、それらの増幅またはそれらの発現が模索される細胞宿主内に１つ以上の複製起点、マーカーもしくは選択可能なマーカーを含有することができる。

【００７０】
用語「選択可能なマーカー」とは、マーカー遺伝子の作用、すなわち抗生物質に対する耐性、除草剤に対する耐性に基づいて選択することのできる通常は抗生物質もしくは化学薬品耐性遺伝子、比色マーカー、酵素、蛍光マーカー等のような同定因子を意味しており、このときその作用を使用すると当該核酸の遺伝形質を追跡する、および／または当該核酸を継承している細胞または生物を同定することができる。当技術分野において知られていて使用されている選択可能なマーカーの例には以下のものが含まれる：アンピシリン、ステレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ヒグロマイシン、ビアラフォス除草剤、スルホンアミド等に対する耐性を提供する遺伝子；および表現型マーカーとして使用される遺伝子、すなわちアントシアニン調節遺伝子、イソペンタニルトランスフェラーゼ遺伝子等。選択可能なマーカー遺伝子は、さらにまたレポーター遺伝子と見なすこともできる。

【００７１】
用語「レポーター遺伝子」とは、レポーター遺伝子の作用に基づいて同定できる同定因子をコードする核酸を意味するが、このときその作用を使用すると、当該核酸の遺伝形質を追跡する、当該核酸を継承している細胞または生物を同定する、および／または遺伝子発現導入もしくは転写を測定することができる。当技術分野において知られていて使用されているレポーター遺伝子の例には以下のものが含まれる：ルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、β－ガラクトシダーゼ（ＬａｃＺ）、β－グルクロニダーゼ（Ｇｕｓ）等。

【００７２】
「プロモーター」とは、コード配列もしくは機能的ＲＮＡの発現を制御することのできるＤＮＡ配列を意味する。一般に、コード配列はプロモーター配列の３’に位置する。プロモーターは、その全体を天然遺伝子に由来することができる、または自然に見いだされる相違するプロモーターから引き出された相違するエレメントから構成することができる、または合成ＤＮＡフラグメントを含むことさえできる。様々なプロモーターが様々な組織または細胞タイプにおける、または様々な発達段階で、または様々な環境的もしくは生理的条件に反応して遺伝子の発現を指示することができることは当業者に理解されている。多くの場合に大多数の細胞タイプにおいて遺伝子の発現を引き起こすプロモーターは、一般に「構成的プロモーター」と呼ばれている。特定細胞タイプにおいて遺伝子の発現を引き起こすプロモーターは、一般に「細胞特異的プロモーター」または「組織特異的プロモーター」と呼ばれている。特定の発達段階または細胞分化段階での遺伝子の発現を引き起こすプロモーターは、一般に「発達段階特異的プロモーター」または「細胞分化特異的プロモーター」と呼ばれている。導入されて、該プロモーターを誘導する物質、生物学的分子、化学薬品、リガンド、光線等による細胞の曝露または処理に引き続いて遺伝子が発現させられることを引き起こすプロモーターは、「誘導性プロモーター」または「調節可能プロモーター」と呼ばれる。さらにまた、多くの場合に調節配列の正確な境界は完全には定義されていないので、様々な長さのＤＮＡフラグメントが同一プロモーター活性を有する可能性があることも認識されている。

【００７３】
「プロモーター配列」は、細胞内でＲＮＡポリメラーゼに結合して下流（３’方向）コード配列の転写を開始させることのできるＤＮＡ調節領域である。本発明を定義するために、プロモーター配列はその３’末端で転写開始部位に結合されていて、バックグラウンドを超える検出可能なレベルで転写を開始させるために必要な最小数の塩基もしくはエレメントを含むように上流（５’）へ伸長している。プロモーター配列内では、転写開始部位（例えば便宜的にヌクレアーゼＳ１を用いてマッピングすることにより定義される）、ならびにＲＮＡポリメラーゼの結合について役割を担っているタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）が見いだされるであろう。

【００７４】
コード配列は、ＲＮＡポリメラーゼがコード配列をｍＲＮＡ内へ転写させ、次にコード配

列がイントロンを含む場合には、コード配列がトランス－ＲＮＡスプライシングされ、さらに該コード配列によりコードされたタンパク質へ翻訳される場合は、細胞内の転写および翻訳制御配列の「制御下」にある。

【００７５】

「転写および翻訳制御配列」は、宿主細胞内でコード配列を発現させるプロモーター、エンハンサー、ターミネーター等のＤＮＡ調節配列である。真核細胞では、ポリアデニル化シグナルは制御配列である。

【００７６】

用語「応答エレメント」とは、第１キメラ遺伝子のＤＮＡ結合ドメインとの相互作用を通して媒介されるプロモーター上の応答性を付与する１つ以上のシス作用性ＤＮＡエレメントを意味する。このＤＮＡエレメントはその配列内でパリンドローム（完全もしくは不完全）であるか、または配列モチーフもしくは様々な多数のヌクレオチドによって分離されたハーフサイト（ｈａｌｆ　ｓｉｔｅ）から構成されてもよい。ハーフサイトは類似もしくは同一であってよく、そして直接繰り返しもしくは逆繰り返しのいずれか、または単一ハーフサイトもしくはタンデム配列での隣接ハーフサイトのマルチダイマーとして配列されてよい。応答エレメントは、その中に応答エレメントが組み込まれる細胞もしくは生物の性質に依存して、様々な生物から単離された最小プロモーターを含んでいてよい。第１ハイブリッドタンパク質のＤＮＡ結合ドメインは、リガンドの存在下または不在下で、応答エレメントのＤＮＡ配列に結合し、この応答エレメントの調節下で１つ以上の下流遺伝子の転写を開始または抑制する。天然エクジソンレポーターの応答エレメントのためのＤＮＡ配列の例には以下のものが含まれる：ＲＲＧＧ／ＴＴＣＡＮＴＧＡＣ／ＡＣＹＹ（Ｃｈｅｒｂａｓ　Ｌ．ら，（１９９１），Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．　５，１２０－１３１を参照）；ＡＧＧＴＣＡＮ（ｎ）ＡＧＧＴＣＡ（式中、Ｎ（ｎ）は１つ以上のスペーサーヌクレオチドであってよい（Ｄ’Ａｖｉｎｏ　ＰＰら，（１９９５），Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．　Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ，１１３，１－９）；およびＧＧＧＴＴＧＡＡＴＧＡＡＴＴＴ（Ａｎｔｏｎｉｅｗｓｋｉ　Ｃ．ら（１９９４），Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．　１４，　４４６５－４４７４を参照）。

【００７７】

用語「機能的に連結した」とは、１つの核酸の機能が他の核酸機能によって影響を受けるような単一核酸フラグメント上での核酸配列の関連を意味する。例えば、プロモーターはそのコード配列の発現に影響を及ぼすことができる（すなわち、コード配列が該プロモーターの転写制御下にある）場合にコード配列と機能的に連結している。コード配列は、センスまたはアンチセンス配向で調節配列へ機能的に連結させることができる。

【００７８】

ここで使用する用語「発現」は、核酸もしくはポリヌクレオチドから引き出されたセンス（ｍＲＮＡ）もしくはアンチセンスＲＮＡの転写および安定性蓄積を意味する。発現は、タンパク質もしくはポリペプチドへのｍＲＮＡの翻訳を意味することもある。

【００７９】

用語「カセット」、「発現カセット」および「遺伝子発現カセット」とは、特定制限部位で、または相同組み換えによって核酸もしくはポリヌクレオチド内に挿入できるＤＮＡのセグメントを意味する。ＤＮＡのセグメントは、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んでおり、そしてカセットおよび制限部位は転写および翻訳のために適正なリーディングフレーム内へのカセットの挿入を保証するように設計される。「形質転換カセット」とは、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、さらに特定宿主細胞の形質転換を容易にするポリヌクレオチドに加えたエレメントを有する特異的ベクターを意味する。本発明のカセット、発現カセット、遺伝子発現カセットおよび形質転換カセットはさらにまた、宿主細胞内の当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を強化できるエレメントも含むことができる。これらのエレメントには、プロモーター、最小プロモーター、エンハンサー、応答エレメント、ターミネータ配列、ポリアデニル化配列等が含まれてよいが、それらに限定されない。

【００８０】
本発明のために、用語「遺伝子スイッチ」とはプロモーターと結び付いている応答エレメントと、そして１つ以上のリガンドの存在下で、その中に応答エレメントおよびプロモーターが組み込まれている遺伝子の発現を変調させる、ＥｃＲに基づく遺伝子発現系との組み合わせを意味する。
【００８１】
用語「変調する」とは、核酸もしくは遺伝子発現を誘導、減少もしくは阻害し、その結果としてタンパク質またはポリペプチド生成の各々の誘導、減少もしくは阻害を生じさせることを意味する。
【００８２】
本発明によるプラスミドもしくはベクターは、さらにまた宿主細胞内での遺伝子の発現を駆動するために適切な少なくとも１つのプロモーターを含んでいてよい。用語「発現ベクター」とは、宿主への形質転換の後に、挿入された核酸配列の発現を可能にするために設計されたベクター、プラスミドもしくはビヒクルを意味する。クローン化遺伝子、すなわち挿入された核酸配列は、通常はプロモーター、最小プロモーター、エンハンサー等の制御エレメントの制御下に置かれる。所望の宿主細胞内の核酸の発現を駆動させるために有用である開始制御領域またはプロモーターは多数あり、当業者にはよく知られている。本発明のためには以下のものを含むがそれらに限定されないこれらの遺伝子を駆動させることのできる実質的に任意のプロモーターが適切である：ウイルスプロモーター、細菌プロモーター、動物プロモーター、哺乳動物プロモーター、合成プロモーター、構成性プロモーター、組織特異的プロモーター、発達特異的プロモーター、誘導性プロモーター、光調節プロモーター；ＣＹＣ１、ＨＩＳ３、ＧＡＬ１、ＧＡＬ４、ＧＡＬ１０、ＡＤＨ１、ＰＧＫ、ＰＨＯ５、ＧＡＰＤＨ、ＡＤＣ１、ＴＲＰ１、ＵＲＡ３、ＬＥＵ２、ＥＮＯ、ＴＰＩ、アルカリホスファターゼプロモーター（サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）内での発現のために有用）；ＡＯＸ１プロモーター（ピチア（Ｐｉｃｈｉａ）属内での発現のために有用；β－ラクタマーゼ、ｌａｃ、ａｒａ、ｔｅｔ、ｔｒｐ、IP_L、IP_R、Ｔ７、ｔａｃ、およびｔｒｃプロモーター（大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）内での発現のために有用）；光調節－、種特異的－、花粉特異的－、子房特異的、病原もしくは疾患関連性、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓ、ＣＭＶ ３５Ｓ最小、カサバ葉脈モザイクウイルス（ＣｓＶＭＶ）、クロロフィルａ／ｂ結合タンパク質、リブロース１，５－ビスホスフェートカルボキシラーゼ、シュート（苗条）特異的、根特異的、キチナーゼ、ストレス誘導性、イネツングロ杵状ウイルス、植物スーパープロモーター、ジャガイモロイシンアミノペプチダーゼ、ナイトレートリダクターゼ、マンノピンシンターゼ、ノパリンシンターゼ、ユビキチン、ゼインタンパク質、およびアントシアニンプロモーター（植物細胞内での発現のために有用）；当技術分野において知られている動物および哺乳動物プロモーターには、ＳＶ４０初期（ＳＶ４０ｅ）プロモーター領域、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）の３’ロングターミナルリピート（ＬＴＲ）内に含まれるプロモーター、アデノウイルス（Ａｄ）のＥ１Ａもしくは主要後期プロモーター（ＭＬＰ）遺伝子のプロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）初期プロモーター、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）チミジンキナーゼ（ＴＫ）プロモーター、バキュロウイルスＩＥ１プロモーター、伸長因子１α（ＥＦ１）プロモーター、ホスホグリセレートキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、ユビキチン（Ｕｂｃ）プロモーター、アルブミンプロモーター、マウスメタロチオネイン－Ｌプロモーターおよび転写制御領域の調節配列、ユビキタスプロモーター（ＨＰＲＴ、ビメンチン、α－アクチン、ツブリン等）、中間フィラメントのプロモーター（デスミン、神経フィラメント、ケラチン、ＧＦＡＰ等）、治療用遺伝子のプロモーター（ＭＤＲ、ＣＦＴＲもしくは第ＶＩＩＩ因子タイプ等の）、病原もしくは疾患関連プロモーター、および例えば膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼＩ遺伝子制御領域、膵臓β細胞において活性なインスリン遺伝子制御領域、リンパ球において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域、精巣、乳房、リンパ球および肥満細胞内で活性なマウス乳腺癌ウイルス制御領域；アルブミン遺伝子、肝臓において活性なＡｐｏ ＡＩおよびＡｐ

ｏ　ＡＩＩ制御領域、肝臓において活性なα－フェトタンパク質遺伝子制御領域、肝臓において活性なα１－アンチトリプシン遺伝子制御領域、骨髄性細胞において活性なβ－グロビン遺伝子制御領域、脳内の乏突起膠細胞胞中で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域、骨格筋において活性なミオシン軽鎖－２遺伝子制御領域、および視床下部において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域のような組織特異性を示しトランスジェニック動物において利用されてきたプロモーター、ピルビン酸キナーゼプロモーター、ビリンプロモーター、脂肪酸結合腸タンパク質のプロモーター、平滑筋細胞α－アクチンのプロモーター等が含まれるがそれらに限定されない。さらに、これらの発現配列はエンハンサーもしくは調節配列等を付加することによって修飾することができる。

【００８３】

本発明の実施形態において使用できるエンハンサーには、以下のものが含まれるがそれらに限定されない：ＳＶ４０エンハンサー、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）エンハンサー、伸長因子１（ＥＦ１）エンハンサー、酵母エンハンサー、ウイルス遺伝子エンハンサー等。

【００８４】

終結制御領域、すなわちターミネーター配列もしくはポリアデニル化配列は、さらにまた好ましい宿主にとって自然な様々な遺伝子に由来することもできる。場合によっては、終結部位が不要になることがあるが、しかし含まれていれば最も好ましい。本発明の好ましい実施形態では、終結制御領域は合成配列、合成ポリアデニル化シグナル、ＳＶ４０後期ポリアデニル化シグナル、ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン（ＢＧＨ）ポリアデニル化シグナル、ウイルスターミネーター配列等を含むことができる、またはそれらに由来することができる。

【００８５】

用語「３’非コード配列」または「３’非翻訳領域（ＵＴＲ）」とは、コード配列の下流（３’）に位置するＤＮＡ配列を意味しており、ポリアデニル化「ポリ（Ａ）」認識配列およびｍＲＮＡプロセッシングまたは遺伝子発現に影響を及ぼすことのできる調節シグナルをコードするその他の配列を含んでいてよい。ポリアデニル化シグナルは、通常はｍＲＮＡ前駆体の３’末端へのポリアデニル酸領域の付加に影響を及ぼすことによって特徴付けられる。

【００８６】

「調節領域」は、第２核酸配列の発現を調節する核酸配列を意味する。調節領域は、特定核酸を発現することについて、天然でその役割を担っている配列（相同領域）を含んでいてよい、または異なるタンパク質もしくは合成タンパク質さえの発現についてその役割を担っている相違する起源の配列（非相同領域）を含んでいてよい。特に、これらの配列は原核生物、真核生物、またはウイルス遺伝子の配列であってよい、または特異的方法で、若しくは非特異的方法で、そして誘導性もしくは非誘導性方法で遺伝子の転写を刺激もしくは抑制する配列に由来することができる。調節領域は、複製起点、ＲＮＡスプライス部位、プロモーター、エンハンサー、転写終結配列、および標的細胞の分泌経路へ該ポリペプチドを方向付けるシグナル配列を含有している。

【００８７】

「非相同起源」からの調節領域は、発現した核酸と自然には結び付いていない調節領域である。特に非相同調節領域に含まれるのは、相違する種からの調節領域、相違する遺伝子からの調節領域、ハイブリッド調節配列、および自然には発生しないが当業者によって設計された調節配列が含まれる。

【００８８】

「ＲＮＡ転写体」とは、ＤＮＡ配列のＲＮＡポリメラーゼ触媒転写の結果として発生する産物を意味する。ＲＮＡ転写体がＤＮＡ配列の完全相補的コピーである場合、ＲＮＡ転写対は一次転写体と呼ばれる、または一次転写体の転写後プロセッシングから引き出されたＲＮＡ配列であってよく、成熟ＲＮＡと呼ばれる。「メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）」とは、イントロンを備えていない、そして細胞によってタンパク質内に翻訳できるＲＮ

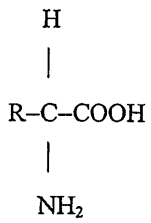
Ａを意味する。「ｃＤＮＡ」とは、ｍＲＮＡに対して相補的でそれから引き出された二本鎖ＤＮＡを意味する。「センス」ＲＮＡとは、ｍＲＮＡを含む、そして細胞によってタンパク質に翻訳できるＲＮＡ転写体を意味する。「アンチセンスＲＮＡ」とは、標的一次転写体もしくはｍＲＮＡの全部もしくは一部に対して相補的であり、標的遺伝子の発現を遮断するＲＮＡ転写体を意味する。アンチセンスＲＮＡの相補性は、特異的遺伝子転写体、すなわち５’非コード配列、３’非コード配列、またはコード配列のいずれかの一部であることができる。「機能的ＲＮＡ」とは、アンチセンスＲＮＡ、リボザイムＲＮＡ、または翻訳はされていないがまだ細胞プロセスに影響を及ぼすその他のＲＮＡを意味する。

【００８９】

「ポリペプチド」は共有結合したアミノ酸残基を含んでなるポリマー化合物である。アミノ酸は以下の一般構造を有する：

【００９０】

【化１】



【００９１】

アミノ酸は、側鎖Ｒに基づいて７群に分類される：（１）脂肪族側鎖、（２）ヒドロキシル（ＯＨ）基を含有する側鎖、（３）硫黄原子を含有する側鎖、（４）酸性もしくはアミド基を含有する側鎖、（５）塩基性基を含有する側鎖、（６）芳香族環を含有する側鎖、および（７）側鎖がアミノ基に融合しているイミノ酸であるプロリン。本発明のポリペプチドは、好ましくは少なくとも約１４アミノ酸を含む。

【００９２】

「タンパク質」は、生きている細胞内で構造的もしくは機能的役割を実施するポリペプチドである。

【００９３】

「単離ポリペプチド」もしくは「単離タンパク質」は、通常はその自然状態においてそれらと結び付いているそれらの化合物（例えば、他のタンパク質もしくはポリペプチド、核酸、炭水化物、脂質）を実質的に含まないポリペプチドもしくはタンパク質である。「単離（された）」は、他の化合物との人工もしくは合成混合物、または生物学的活性を妨害しない、そして例えば不完全な精製、安定剤の添加、または医薬上許容される調製物内への複合を原因として存在することがある不純物の存在を排除することは意図されていない。

【００９４】

本発明によるポリペプチドの「フラグメント」は、それのアミノ酸配列が参照ポリペプチドのアミノ酸配列より短い、そしてこれらの参照ポリペプチドを含む全部分に渡って同一アミノ酸配列を含むポリペプチドを意味すると理解される。このようなフラグメントは、適切な場合はそれらが一部である、より大きなポリペプチドに含まれていてよい。本発明によるポリペプチドのこのようなフラグメントは、少なくとも２～３００アミノ酸の長さを有していてよい。

【００９５】

「非相同タンパク質」とは、細胞内で自然には生成しないタンパク質を意味する。

【００９６】

「成熟タンパク質」とは、翻訳後プロセシングされたポリペプチド、すなわち、一次翻訳産物中に存在するあらゆるプレペプチドもしくはプロペプチドが取り除かれているポリペプチドを意味する。「前駆体」タンパク質とは、ｍＲＮＡの一次翻訳産物を意味する、すなわちまだプレペプチドおよびプロペプチドが存在する。プレペプチドおよびプロペプチドは細胞内局在化シグナルであってよいが、それらに限定されない。

【００９７】

用語「シグナルペプチド」は、分泌成熟タンパク質に先行するアミノ末端ポリペプチドを意味する。シグナルペプチドは成熟タンパク質から開裂されるので、このため成熟タンパク質内には存在しない。シグナルペプチドは細胞膜を横断して分泌タンパク質を方向付けて移動させる機能を有する。シグナルペプチドは、シグナルタンパク質とも呼ばれる。

【００９８】

「シグナル配列」は、細胞の表面上で発現するタンパク質のコード配列の先頭に含まれる。この配列は、宿主細胞にポリペプチドを移動させるように指示する、成熟ポリペプチドへのＮ－末端にあるシグナルペプチドをコードする。用語「転位（ｔｒａｎｓｌｏｃａｔｉｏｎ）シグナル配列」は、ここではこの種のシグナル配列を意味するために使用する。転位シグナル配列は、真核生物および原核生物にとって自然である様々なタンパク質と結び付いて見いだされ、多くの場合に両方のタイプの生物において機能的である。

【００９９】

用語「相同性」とは、２つのポリヌクレオチド間または２つのポリペプチド部分間の同一性パーセントを意味する。１つの部分からの配列と、他の成分との配列間の対応は、当技術分野において知られている方法によって決定できる。例えば、相同性は配列情報をアラインメントし、そして容易に利用できるコンピュータープログラムを使用することによって、２つのポリペプチド分子間の配列情報の直接比較によって決定できる。あるいはまた、相同性は相同領域間で安定な二本鎖を形成する条件下でのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、その後の一本鎖特異的ヌクレアーゼを用いた消化および消化されたフラグメントのサイズ決定によって決定できる。

【０１００】

ここで使用するあらゆるその文法的な形および綴り上の変形を含む用語「相同の」とは、スーパーファミリー（例、免疫グロブリンスーパーファミリー）からのタンパク質および相違する種からの相同タンパク質（例、ミオシン軽鎖等）をはじめとする、「共通進化起源」を有するタンパク質間の関係を意味する（Ｒｅｅｃｋら，　１９８７，　Ｃｅｌｌ　５０：６６７）。このようなタンパク質（およびそれらがコードする遺伝子）は、それらの高度の配列類似性によって反映されるような配列相同性を有する。しかし、一般的使用および本出願では、用語「相同」は、「高度に」のような副詞を用いて修飾される場合は、配列類似性を意味して、共通進化起源を意味しなくてもよい。

【０１０１】

したがって、すべてのその文法的な形での「配列類似性」は、共通進化起源を共有する、または共有しないタンパク質の核酸もしくはアミノ酸配列間の同一性または対応の程度を意味する（Ｒｅｅｃｋら，　１９８７，　Ｃｅｌｌ　５０：６６７を参照）。

【０１０２】

特定実施形態では、２つのＤＮＡ配列は、ヌクレオチドの少なくとも約５０％（好ましくは少なくとも約７５％、および最も好ましくは少なくとも約９０もしくは９５％）がＤＮＡ配列の規定長に渡って一致する場合に「実質的相同」または「実質的類似」である。実質的相同である配列は、例えば特定系について定義されたストリンジェンシー条件下で、配列データバンクまたはサザンハイブリダイゼーション実験で利用できる標準ソフトウエアを使用して配列を比較することによって同定できる。適切なハイブリダイゼーション条件を規定することは、当技術分野の技能の範囲内である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら，　１９８９，　上記を参照。

【０１０３】

ここで使用する「実質的類似」とは、１つ以上のヌクレオチド塩基における変化は１つ以

上のアミノ酸の置換を生じさせるが、ＤＮＡ配列によってコードされたタンパク質の機能的特性には影響を及ぼさないような、核酸フラグメントに関する。「実質的類似」は、１つ以上のヌクレオチド塩基における変化はアンチセンスもしくは共抑制テクノロジーによる遺伝子発現の変化を媒介する核酸フラグメントの能力には影響を及ぼさないような、核酸フラグメントにも関する。「実質的類似」は、結果として生じる転写体の機能的特性へ実質的に影響を及ぼさない１つ以上のヌクレオチド塩基の欠失もしくは挿入のような本発明の核酸フラグメントの修飾にも関する。このため、本発明は特定の代表的配列より多くのものを含むと理解されている。提案された修飾の各々は、コードされた産物の生物学的活性の保持の決定のような当技術分野における日常的技術の範囲内である。

【０１０４】

さらに、当業者は、本発明に含まれる実質的類似配列はさらにまたそれらが、ここに例示した配列を用いてストリンジェンシー条件（０．１×ＳＳＣ、０．１％　ＳＤＳ、６５℃でのハイブリダイゼーションおよび２×ＳＳＣ、０．１％　ＳＤＳ、その後に０．１×ＳＳＣ、０．１％　ＳＤＳによる洗浄）下で、ハイブリダイズする能力によって規定されることを認識している。本発明の実質的類似核酸フラグメントは、それらのＤＮＡ配列がここに報告した核酸フラグメントのＤＮＡ配列と少なくとも７０％同一である核酸フラグメントである。本発明の好ましい実質的核酸フラグメントは、それらのＤＮＡ配列がここに報告した核酸フラグメントのＤＮＡ配列と少なくとも８０％同一である核酸フラグメントである。より好ましい核酸フラグメントは、ここに報告した核酸フラグメントのＤＮＡ配列に少なくとも９０％同一である。さらにより好ましい核酸フラグメントは、ここに報告した核酸フラグメントのＤＮＡ配列に少なくとも９５％同一である。

【０１０５】

２つのアミノ酸配列は、アミノ酸配列の約４０％超が同一である、または６０％超が類似（機能的に同一）である場合に「実質的相同」または「実質的類似」である。好ましくは、類似もしくは相同配列は、例えばＧＣＧ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ、ＧＣＧパッケージのためのプログラムマニュアル、バージョン７、マディソン、ウィスコンシン州）パイルアッププログラムを使用したアラインメントによって同定される。

【０１０６】

用語「～に対応する」は、それに対する類似性もしくは相同性が測定される分子と正確な位置が同一であるか、または相違するかにかかわらず、ここでは類似もしくは相同配列を言及するために使用する。核酸もしくはアミノ酸配列アラインメントはスペースを含有することがある。そこで、用語「～に対応する」は、配列類似性に関するものでアミノ酸残基またはヌクレオチド塩基の数には関連しない。

【０１０７】

アミノ酸もしくはヌクレオチド配列の「実質的部分」は、当業者による配列の手動評価、またはコンピュータによる自動配列比較および例えばＢＬＡＳＴ（Ｂａｓｉｃ　Ｌｏｃａｌ　Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｔｏｏｌ；Ａｌｔｓｃｈｕｌ，　Ｓ．Ｆ．ら，（１９９３）　Ｊ　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．　２１５：４０３－４１０；さらにｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴ／も参照されたい）のようなアルゴリズムを使用する同定のいずれかによってそのポリペプチドもしくは遺伝子を推定上同定するために十分なポリペプチドのアミノ酸配列または遺伝子のヌクレオチド配列を含む。一般に、ポリペプチドもしくは核酸配列を既知のタンパク質もしくは遺伝子と相同であると推定上同定するためには１０個以上の連続アミノ酸または３０個以上のヌクレオチドの配列が必要である。さらに、ヌクレオチド配列に関して、２０～３０連続ヌクレオチドを含む遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブは遺伝子同定（例、サザンハイブリダイゼーション）および単離（例、細菌コロニーもしくはバクテリオファージプラークのインサイチューハイブリダイゼーション）の配列依存方法において使用できる。さらに、１２～１５塩基の短いオリゴヌクレオチドは、プライマーを含む特定核酸フラグメントを入手するためにＰＣＲにおける増幅プライマーとして使用できる。したがって、ヌクレオチド配列の

「実質的部分」は該配列を含む核酸フラグメントを特別に同定および／または単離するために十分な配列を含む。

【０１０８】

当技術分野において知られている用語「同一性パーセント」とは、配列を比較することによって決定されるような２つ以上のポリペプチド配列間または２つ以上のポリヌクレオチド配列間の関係である。当技術分野では、「同一性」はさらにまた、場合によっては、このような配列の鎖間の一致によって決定されるような、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド配列間の配列関連度も意味する。「同一性」および「類似性」は、以下に記載されているものを含むがそれらに限定されないよく知られた方法によって容易に計算できる：「計算分子生物学（Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）」（Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｍ．編集），Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク（１９８８）；「生物計算：インフォーマティクスおよびゲノムプロジェクト（Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ：Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｊｅｃｔｓ）」（Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｗ．編集），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク（１９９３）；「配列データのコンピューター解析、第Ｉ部（Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄａｔａ，Ｐａｒｔ Ｉ）」（Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．，ａｎｄ Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ｈ．Ｇ．編集），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ、ニュージャージー（１９９４）；「分子生物学における配列解析（Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）」（ｖｏｎ Ｈｅｉｎｊｅ，Ｇ．編集），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９８７）；および「配列解析プライマー（Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐｒｉｍｅｒ）」（Ｇｒｉｂｓｌｃｏｖ，Ｍ．ａｎｄ Ｄｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．編集），Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク（１９９１）。同一性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間の最高の一致を与えるように設計される。同一性および類似性を決定する方法は、公然と入手できるコンピュータプログラムに体系化されている。配列アラインメントおよび同一性パーセント計算は、ＬＡＳＥＲＧＥＮＥ ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ ｓｕｉｔｅ（ＤＮＡＳＴＡＲ 社、マディソン、ウィスコンシン州）のＭｅｇａｌｉｇｎプログラムを使用して実施できる。配列のマルチプルアラインメントはデフォルトパラメーター（ギャップペナルティ＝１０、ギャップ長ペナルティー＝１０）を用いるＣｌｕｓｔａｌアライメント法（Ｈｉｇｇｉｎｓ ａｎｄ Ｓｈａｒｐ（１９８９）ＣＡＢＩＯＳ．５：１５１－１５３）を使用して実施できる。Ｃｌｕｓｔａｌ法を使用したペアワイズアラインメントのためのデフォルトパラメーターを選択できる：ＫＴＵＰＬＥ １、ギャップペナルティ＝３、ウィンドウ＝５およびダイアゴナルズ セイブド＝５。

【０１０９】

用語「配列解析ソフトウエア」は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の解析のために有用であるあらゆるコンピューターアルゴリズムまたはソフトウエアプログラムを意味している。「配列解析ソフトウエア」は、市販で入手できる、または独立して開発できる。典型的な配列解析ソフトウエアは、ＧＣＧプログラム一式（ウィスコンシンパッケージバージョン９．０，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ）、マディソン、ウィスコンシン州）、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、ＢＬＡＳＴＸ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０（１９９０）、およびＤＮＡＳＴＡＲ（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．１２２８ Ｓ．Ｐａｒｋ Ｓｔ．、マディソン、ウィスコンシン州５３７１５、米国）を含むが、それらに限定されない。本出願の状況内では、解析のために配列解析ソフトウエアが使用される場合は、他に規定されていない限り、解析の結果は参照されたプログラムの「デフォルト値」に基づくと理解される。ここで使用する「デフォルト値」は、最初に初期化されるときに最初にソフトウエアを用いてロードされる数値もしくはパラメータのセットを意味する。

【０１１０】

「合成遺伝子」は、当業者に知られている方法を使用して化学合成されているオリゴヌク

レオチド構築ブロックから組み立てることができる。これらの構築ブロックは、全遺伝子を構築する目的で酵素的に組み立てられる遺伝子セグメントを形成するようにライゲーションおよびアニール化される。ＤＮＡ配列に関連した「化学合成（された）」は、構成要素ヌクレオチドがインビトロで組み立てられたことを意味する。ＤＮＡの手動化学合成は、明確に確立された方法を使用して遂行できる、または自動化学合成は多数の市販で入手できる機械の１つを使用して実施できる。したがって、遺伝子は宿主細胞のコドンバイアスを反映させるためにヌクレオチド配列の最適化に基づく最適遺伝子発現のために仕立てることができる。当業者であれば、コドン使用が宿主の好むコドンに向かって偏っていれば遺伝子発現が成功する可能性を理解する。好ましいコドンの決定は、配列情報を入手できる宿主細胞から引き出された遺伝子の調査に基づくことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【０１１１】

コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

本発明は、全長コナジラミエクジソン受容体タンパク質、およびそれらのいずれかのコナジラミエクジソン受容体特異的フラグメントを含む、本発明のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードする新規ポリヌクレオチドを提供する。

【０１１２】

本発明の特定実施形態によると、新規エクジソン受容体ポリペプチドの部分をコードする核酸配列が解明され、特徴付けられている。詳細には、コナジラミからの同翅目エクジソン受容体ＢａＥｃＲをコードするポリヌクレオチドが特徴付けられている。全長コード配列が決定され、ここでは配列番号：１のヌクレオチド１０２～１３４９として提示されている。さらに、全長ＢａＥｃＲポリペプチドをコードするこのポリヌクレオチド内のドメインが画定され、ここでは表１に記載したように提示されている。

【０１１３】

表１．コナジラミエクジソン受容体（「ＢａＥｃＲ」）の様々なドメインおよびヘリックスに対応するヌクレオチドおよびアミノ酸配列。

【０１１４】

【表１】

全長BaEcR もしくはBaEcRドメイン	配列番号:1のヌクレオチド	配列番号:2のアミノ酸
A/BCDE(全長)	102-1349	1-416
A/B	102-258	1-52
C	259-457	53-118
D	458-677	119-192
E	678-1349	193-416
CDE	259-1349	53-416
DE	458-1349	119-416
ヘリックス1～12	648-1349	183-416

【０１１５】

そこで、本発明の第１主題は、新規エクジソン受容体ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドに関する。より詳細には、本発明は、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドに関する。特定実施形態では、単離ポリヌクレオチドは、配列番号：１、配列番号：１のヌクレオチド１０２～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド１０２～２５８、配列番号：１のヌクレオチド２５９～４５７、配列番号：１のヌクレオチド４５８～６７７、配列番号：１のヌクレオチド６７８～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド２５９～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド４５８～１３４９、および配列番号：１のヌクレオチド６４８～１３４９からなる群から選択された核酸配列を含む。また別の特定実施形態では、単離ポリヌクレオチドは配列番号：１に記載の核酸配列を含む。また別の特定実施形態では、単離ポリヌクレオチドは配列番号：１のヌ

クレオチド１０２～１３４９に記載の核酸配列を含む。また別の特定実施形態では、単離ポリヌクレオチドは宿主細胞内のポリペプチドの発現を許容する領域をさらに含む。

【０１１６】

本発明はさらにまた、配列番号：２、配列番号：２のアミノ酸１～５２、配列番号：２のアミノ酸５３～１１８、配列番号：２のアミノ酸１１９～１９２、配列番号：２のアミノ酸１９３～４１６、配列番号：２のアミノ酸５３～４１６、配列番号：２のアミノ酸１１９～４１６、および配列番号：２のアミノ酸１８３～４１６からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドに関する。特定実施形態では、単離ポリヌクレオチドは配列番号：２に記載のアミノ酸配列を含むコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードする。

【０１１７】

本発明は、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードする新規単離ポリヌクレオチドを提供する。このエクジソン受容体の配列および構造が解明されたので、リガンド結合ドメインを含むコナジラミ受容体ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを個別に、または組み合わせて使用すると、このリガンド結合ドメインに結合する新規リガンドについてスクリーニングすることができる。そこで、例えば本発明によるエクジソン受容体ポリペプチドを使用すると、それに対して感受性アッセイが存在するレポーター遺伝子の発現を制御することができる。リガンド結合ドメインは、コナジラミエクジソン受容体のアゴニストまたはアンタゴニストのどちらかとして有用である新規分子をスクリーニングするための試薬として機能することができる。新規クラスの分子をスクリーニングできる、または既知のリガンドからの選択された修飾を使用できる。これらの新規リガンドは高度に特異的かつ高度に活性な天然由来殺虫剤として利用される。そこで、本発明は新規リガンド分子に対するスクリーニングを提供する。

【０１１８】

本発明のポリヌクレオチドは、Ｂａｍｅｃｉａおよびその他の遺伝的起源の両方での相同核酸配列に対するスクリーニング用プローブも提供する。このスクリーニングは、脊椎動物および無脊椎動物両方からの相同遺伝子の単離を許容する。

【０１１９】

したがって、いずれかのコナジラミ細胞はコナジラミエクジソン受容体ポリヌクレオチドの分子クローニングのための核酸起源として潜在的に役立つことができる。ポリヌクレオチドは、当技術分野において知られている標準方法によってクローン化ＤＮＡ（例、ＤＮＡ「ライブラリー」）から入手でき、そして好ましくはタンパク質の高レベル発現を備える組織から調製されたｃＤＮＡライブラリーから化学合成、ｃＤＮＡクローニング、または所望の細胞から精製されたゲノムＤＮＡもしくはそのフラグメントのクローニングによって入手される（例えばＳａｍｂｒｏｏｋら，１９８９，上記；Ｇｌｏｖｅｒ，Ｄ．Ｍ．（編集），１９８５，「ＤＮＡクローニング：実用的アプローチ（ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ）」，ＭＲＬ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｔｄ．，オックスフォード、英国、第Ｉ、ＩＩ巻）。ゲノムＤＮＡから引き出されたクローンは、コード領域に加えて調節およびイントロンＤＮＡ領域を含んでいてよい；ｃＤＮＡから引き出されたクローンはイントロン配列を備えていない。起源が何であっても、ポリヌクレオチドは該ポリヌクレオチドを増幅させるために適切なベクター内へ分子クローン化されなければならない。

【０１２０】

ＤＮＡフラグメントが生成されると、所望のコナジラミエクジソン受容体ポリヌクレオチドを含有する特定ＤＮＡフラグメントの同定は多数の方法で遂行できる。例えば、ＤＮＡフラグメントは標識されたプローブへの核酸ハイブリダイゼーションによってスクリーニングできる（Ｂｅｎｔｏｎ ａｎｄ Ｄａｖｉｓ，１９７７，Ｓｃｉｅｎｃｅ １９６：１８０；Ｇｒｕｎｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｈｏｇｎｅｓｓ，１９７５，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７２：３９６１）。プローブへの実質的相同性を備えるそれらのＤＮＡフラグメントはハイブリダイズするであろう。上述

のように、相同性の程度が大きければ大きいほど、よりストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を使用できる。

【０１２１】

より詳細な選択は、該ポリヌクレオチドが等電性かつ電気泳動性のアミノ酸組成を有するポリペプチド、またはここに開示したようにコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドの部分アミノ酸配列をコードする場合は、該ポリヌクレオチドの特性に基づいて実施できる。そこで、該ポリヌクレオチドの存在はその発現産物の物理的、化学的、または免疫学的特性に基づいたアッセイによって検出できる。例えば、ｃＤＮＡクローン、または適正なｍＲＮＡをハイブリッド選択するＤＮＡクローンは、例えばコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドに対して知られているような、類似もしくは同一の電気泳動、等電点電気泳動もしくは非平衡ｐＨゲル電気泳動挙動、タンパク質分解マップ、または抗原特性を有するポリペプチドを生成するように選択できる。特定実施形態では、発現したポリペプチドは、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドに対して特異的なエピトープに対して生成されるポリクローナル抗体によって認識される。

【０１２２】

ヌクレオチドコード配列の縮退のために、単一アミノ酸変異を含有するアミノ酸配列を含むここに開示したコナジラミエクジソン受容体ポリヌクレオチドと実質的同一なアミノ酸配列をコードする他のポリヌクレオチドは、本発明の実践において使用できる。これらには、配列内の同一アミノ酸残基をコードする異なるコドンの置換によって変化させられる、したがってサイレント変化を生じさせるコナジラミエクジソン受容体ポリヌクレオチドの全部もしくは部分を含む対立遺伝子、他の種からの相同遺伝子、およびヌクレオチド配列が含まれるがそれらに限定されない。同様に、本発明のコナジラミエクジソン受容体誘導体には、一次アミノ酸配列として、その中で機能的同等のアミノ酸残基が配列内の残基と置換されて結果として保存的アミノ酸置換が生じている変化した配列を含むコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドのアミノ酸配列の全部もしくは部分を含むものが含まれるがそれらに限定されない。例えば、配列内の１つ以上のアミノ酸残基は類似のポラリティーの別のアミノ酸によって置換され得るが、これは機能的等価物として機能し、サイレント変化を生じさせる。配列内のアミノ酸に対する置換基は、該アミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択されてよい。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸にはアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが含まれる。芳香族環構造を含有するアミノ酸は、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンである。極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれる。正荷電（塩基性）アミノ酸にはアルギニン、リシンおよびヒスチジンが含まれる。負荷電（酸性）アミノ酸にはアスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。このような変化は、当技術分野において知られている様々な方法によって作り出すことができ（Ｓａｍｂｒｏｏｋら，１９８９，下記）、そしてポリアクリルアミドゲル電気泳動、または等電点によって測定されるような見かけの分子量に影響を及ぼさないと予想される。

【０１２３】

本発明は、さらにまた本発明によるポリヌクレオチドによってコードされる単離コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドに関する。

【０１２４】

コナジラミエクジソン受容体ポリペプチド

本発明は、全長コナジラミエクジソン受容体タンパク質、およびそれらのいずれかのコナジラミエクジソン受容体特異的ポリペプチドフラグメントを含む、新規単離コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドを提供する。

【０１２５】

そこで、本発明は、単離エクジソン受容体ポリペプチドに関する。より詳細には、本発明は、単離コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドに関する。特定実施形態では、該単離エクジソン受容体ポリペプチドは配列番号：２、配列番号：２のアミノ酸１～５２、配列

番号：２のアミノ酸５３～１１８、配列番号：２のアミノ酸１１９～１９２、配列番号：２のアミノ酸１９３～４１６、配列番号：２のアミノ酸５３～４１６、配列番号：２のアミノ酸１１９～４１６、および配列番号：２のアミノ酸１８３～４１６からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む。また別の特定実施形態では、該単離エクジソン受容体ポリペプチドは配列番号：２に記載のアミノ酸配列を含む。

【０１２６】

また別の特定実施形態では、該単離エクジソン受容体ポリペプチドは、配列番号：１、配列番号：１のヌクレオチド１０２～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド１０２～２５８、配列番号：１のヌクレオチド２５９～４５７、配列番号：１のヌクレオチド４５８～６７７、配列番号：１のヌクレオチド６７８～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド２５９～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド４５８～１３４９、および配列番号：１のヌクレオチド６４８～１３４９からなる群から選択された核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。また別の特定実施形態では、該単離エクジソン受容体ポリペプチドは配列番号：１に記載の核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。また別の特定実施形態では、該単離エクジソン受容体ポリペプチドは配列番号：１のヌクレオチド１０２～１３４９に記載の核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。

【０１２７】

当業者であれば、本発明およびここに記載された遺伝子コードの縮退もしくは非普遍性を利用することによって、本発明のポリペプチドをコードするために他のポリヌクレオチドを生成することができる。

【０１２８】

本発明の追加実施形態には本発明によるエクジソン受容体ポリペプチドが含まれるが、このとき該エクジソン受容体ポリペプチドは天然で関連する細胞成分を実質的に含まない。このようなポリペプチドは、典型的には非相同、もしくは通常は非隣接のタンパク質ドメインへ融合した本発明のエクジソン受容体ポリペプチドからのセグメントを含む全長タンパク質、機能的フラグメント、または融合タンパク質のいずれかであってよい。好ましくは、該エクジソン受容体ポリペプチドは、トランス活性化ドメイン、ＤＮＡ結合ドメイン、リガンド結合ドメイン、ヒンジ領域、またはヘテロダイマー化ドメインを含む。より好ましくは、該エクジソン受容体ポリペプチドは、ステロイドリガンドおよび非ステロイドリガンドからなる群から選択されたリガンドへ結合することのできるリガンド結合ドメインを含む。所望であれば、該エクジソン受容体ポリペプチドはハイブリッドポリペプチドを生成させるために第２ポリペプチドへ融合させてよい。好ましくは、第２ポリペプチドはステロイドホルモン核受容体スーパーファミリーからの非相同ポリペプチドである。

【０１２９】

実質的全長ポリペプチドの他に、本発明は該ポリペプチドの生物学的活性フラグメントを提供する。重大な生物学的活性には、トランス活性化活性、リガンド結合、ＤＮＡ結合、ヘテロダイマー化活性、免疫学的活性およびその他のステロイド受容体スーパーファミリーメンバーに特徴的な生物学的活性が含まれる。免疫学的活性には、標的免疫系中での免疫学的機能、ならびにエクジソン受容体エピトープにとってのコンペティターまたは代替抗原のいずれかとして機能する結合のための免疫学的エピトープの共有の両方が含まれる。

【０１３０】

例えば、トランス活性化、リガンド結合、またはＤＮＡ結合ドメインは、異なる新規融合ポリペプチドまたはフラグメントの間で「スワッピング」されてよい。そこで、新規の特異性の組み合わせを示す新規ハイブリッドポリペプチドは、トランス活性化、リガンド結合特異性、またはＤＮＡ結合ドメインの機能的連結の結果として生じる。これは、誘導性発現系の設計において特別に有用である。

【０１３１】

免疫学的目的では、免疫原はポリペプチドセグメントをタンデムに繰返素ことにより生成

でき、それによって高度に抗原性のタンパク質を生成する。あるいはまた、そのようなポリペプチドは特異的結合のための高度に効率的なコンペティターとして機能するであろう。ＢａＥｃＲに対する抗体の生成については以下で記載する。

【０１３２】

本発明は、さらにまたＢａＥｃＲのフラグメントを含む他のポリペプチドも提供する。そこで、ＢａＥｃＲセグメントと他の相同もしくは非相同タンパク質の間の融合ポリペプチドが提供される。相同ポリペプチドは、例えば１メンバーのリガンド特異性および他のメンバーのＤＮＡ結合特異性を示すハイブリッドタンパク質を生じさせるような相違するステロイド受容体スーパーファミリーメンバー間の融合であってよい。同様に、誘導タンパク質の特性または活性の組み合わせを示すような非相同融合が構築されてもよい。典型的な例は、所望のリガンドの存在もしくは位置を容易に決定できるように、例えばルシフェラーゼのようなレポーターポリペプチドと例えばＤＮＡ結合ドメインのような受容体の他のドメインとの融合である。例えば、参照してここに組み込まれるＤｕｌｌらの米国特許第４，８５９，６０９号を参照されたい。その他の典型的遺伝子融合パートナーには、ＤＮＡ結合タンパク質間の「亜鉛フィンガー」セグメントスワッピング、細菌β－ガラクトシダーゼ、ｔｒｐＥタンパク質Ａ、β－ラクタマーゼ、α－アミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼおよび酵母α交配因子が含まれる。例えば、Ｇｏｄｏｗｓｋｉら（１９８８），　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４１：８１２－８１６を参照。

【０１３３】

そこで、本発明はさらにまたａ）トランス活性化ドメイン、ＤＮＡ結合ドメイン、およびコナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインを含む単離ポリペプチドと；ｂ）ＤＮＡ結合ドメインおよびコナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインを含む単離ポリペプチドと；およびｃ）トランス活性化ドメインおよびコナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインを含む単離ポリペプチドとからなる群から選択された単離ポリペプチドを提供する。好ましくは、該コナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインは、配列番号：２、配列番号：２のアミノ酸１９３～４１６、配列番号：２のアミノ酸５３～４１６、配列番号：２のアミノ酸１１９～４１６、および配列番号：２のアミノ酸１８３～４１６からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む。また別の好ましい実施形態では、該コナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインは、配列番号：１、配列番号：１のヌクレオチド１０２～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド６７８～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド２５９～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド４５８～１３４９、および配列番号：１のヌクレオチド６４８～１３４９からなる群から選択された核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。

【０１３４】

そこで、本発明はさらにまたａ）トランス活性化ドメイン、ＤＮＡ結合ドメイン、およびコナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインを含む単離ハイブリッドポリペプチドと；ｂ）ＤＮＡ結合ドメインおよびコナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインを含む単離ハイブリッドポリペプチドと；およびｃ）トランス活性化ドメインおよびコナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインを含む単離ハイブリッドポリペプチドとからなる群から選択された単離ハイブリッドポリペプチドを提供する。好ましくは、該コナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインは、配列番号：２、配列番号：２のアミノ酸１９３～４１６、配列番号：２のアミノ酸５３～４１６、配列番号：２のアミノ酸１１９～４１６、および配列番号：２のアミノ酸１８３～４１６からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む。また別の好ましい実施形態では、該コナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインは、配列番号：１、配列番号：１のヌクレオチド１０２～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド６７８～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド２５９～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド４５８～１３４９、および配列番号：１のヌクレオチド６４８～１３４９からなる群から選択された核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。

【０１３５】

本発明は、さらにまた本発明による単離ポリペプチドを含む組成物に関する。

【０１３６】

組成物

本発明は、さらにまた本発明による単離ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含む組成物に関する。このような組成物は、上記に定義したようなコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドまたはポリヌクレオチド、および許容される担体もしくはビヒクルを含むことができる。本発明の組成物は、遺伝子発現変調系または本発明によるリガンドスクリーニングアッセイにおいて使用するための生物学的物質を調製するために特に適合する。そこで、好ましい実施形態では、該組成物はコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。また別の好ましい実施形態では、該組成物は本発明によるコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドを含む。

【０１３７】

語句「許容される」とは、投与されたときに細胞または生物が生理学的に忍容できる分子実体および組成物に関連する。用語「担体」は、それと一緒に該組成物が投与される希釈剤、アジュバント、付形剤、またはビヒクルを意味する。このような担体は、水、および例えばピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等のような石油、動物、植物または合成起源のものを含む油のような滅菌液であってよい。許容される担体の例は、食塩液、緩衝食塩液、等張食塩液（例、リン酸一ナトリウムもしくは二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウムもしくはマグネシウム、またはそのような塩の混合物）、リンゲル液、デキストロース、水、滅菌水、グリセロール、エタノール、およびそれらの組み合わせである。１，３－ブタンジオールおよび滅菌不揮発性油は、溶媒または懸濁媒体として便宜的に使用される。合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む任意のブランドの不揮発性油を使用できる。オレイン酸のような脂肪酸は、注射可能な調製物においても利用される。水もしくは水溶液、食塩水およびデキストロース水溶液およびグリセロール溶液は、好ましくは特に注射溶液のための担体として使用される。適切な医薬用担体は、Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎによる「レミントンの製薬科学（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）」に記載されている。本発明の医薬組成物は、局所、経口、非経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下、眼内等への投与のために調製できる。

【０１３８】

好ましくは、該組成物は注射用調製物のための許容されるビヒクルを含む。このビヒクルは、詳細には、滅菌、等張性食塩溶液（リン酸一ナトリウムもしくは二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウムもしくはマグネシウム等またはそのような塩の混合物）、または適切に滅菌水もしくは生理的食塩液を加えると注射溶液が形成されることを可能にする無水の、特別には凍結乾燥組成物であってよい。好ましい滅菌注射用調製物は、非毒性の非経口的に許容される溶剤もしくは希釈剤中の溶液または懸濁液であってよい。

【０１３９】

さらにまた別の実施形態では、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチド、または該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物は、除放系で送達することができる。例えば、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、静脈内注射、埋込型浸透圧ポンプ、経皮的パッチ、リポソーム、またはその他の投与様式を使用して投与することができる。その他の除放系はＬａｎｇｅｒによるレビュー［Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３（１９９０）］の中で考察されている。

【０１４０】

コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドの発現

受容体ポリペプチドの配列およびそれらをコードするポリヌクレオチドを用いると、大量のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドを調製できる。細胞内でのベクターの適切な発現によって、高度に効率的な生成を達成することができる。その後、例えば硫酸アンモニウム沈降法、カラムクロマトグラフィー、電気泳動法、遠心分離、結晶化およびその他

のような標準精製方法を使用できる。タンパク質精製のために典型的に使用される方法については「酵素学における方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ）」の種々の巻を参照されたい。あるいはまた、一部の実施形態では高度に効率的な生成は必要ではないが、注意深く工学的に作り出された発現系内での既知の誘導タンパク質の存在は極めて貴重である。例えば、発現系内で（３）対応するコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドと一緒に（２）所望の遺伝子配列へ機能的に連結した（１）リガンド応答性エンハンサーまたは応答エレメントの組み合わせは、特に誘導発現系を提供する。典型的には、該発現系は細胞であるが、インビトロ発現系もまた構築することができる。

【０１４１】

コナジラミエクジソン受容体をコードするポリヌクレオチド、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ、またはそれらのキメラタンパク質を含む機能的活性誘導体は、適切な発現ベクター、すなわち挿入されたタンパク質コード配列の転写および翻訳のために必要なエレメントを含むベクターに挿入できる。そこで、本発明のポリヌクレオチドは本発明の発現ベクター内の転写制御配列と機能的に連結している。ｃＤＮＡおよびゲノム配列のどちらもクローン化して、そのような調節配列の制御下で発現させることができる。発現ベクターは、さらに好ましくは複製起点を含む。

【０１４２】

本発明の単離ポリヌクレオチドは、いずれか適切なクローニングベクター内に挿入できる。当技術分野において知られている多数のベクター－宿主系を使用できる。考えられるベクターには、プラスミドもしくは修飾ウイルスが含まれるがそれらに限定されず、該ベクター系は使用される宿主細胞と適合しなければならない。ベクターの例には、大腸菌、例えばラムダ誘導体のようなバクテリオファージ、または例えばｐＧＥＸベクター、ｐｍａｌ－ｃ、ｐＦＬＡＧ等のようなｐＢＲ３２２誘導体もしくはｐＵＣプラスミド誘導体のようなプラスミドが含まれるが、それらに限定されない。クローニングベクター内への挿入は、例えば相補的粘着末端を有するクローニングベクター内へ該ポリヌクレオチドをライゲートすることによって遂行できる。しかし、該ポリヌクレオチドをフラグメント化するために使用する相補的制限部位が該クローニングベクター内に存在しない場合、該ポリヌクレオチドの末端は酵素修飾することができる。あるいはまた、所望の部位はヌクレオチド配列（リンカー）をＤＮＡ末端上にライゲートすることによって生成できる；これらのライゲートされたリンカーは制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする特定の化学合成オリゴヌクレオチドを含んでいてよい。好ましくは、クローン化遺伝子は、クローニング細胞内での増幅、および引き続いてそれが所望の場合には適切な発現細胞系内へ挿入するための精製を提供するシャトルベクタープラスミド上に含有されている。例えば、１つ以上の生物のタイプ内で複製できるベクターであるシャトルベクターが、Ｅ．　ｃｏｌｉプラスミドからの配列を酵母２μプラスミドからの配列と連結することによって大腸菌およびサッカロミセス・セレビジエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のどちらでも複製のために調製できる。

【０１４３】

さらに、本発明は転写調節エレメントへ機能的に連結した本発明によるポリヌクレオチドを含む発現ベクターに関する。好ましくは、該ポリヌクレオチドは発現コンピテント宿主細胞内での核受容体リガンド結合ドメインの発現を許容する発現制御配列と機能的に連結している。発現制御配列は、その中での発現が所望である宿主細胞内で機能的であるプロモーターを含むことができる。該ベクターは、プラスミドＤＮＡ分子またはウイルスベクターであってよい。好ましいウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、およびワクシニアウイルスが含まれる。本発明は、さらにそのゲノム内に本発明によるポリヌクレオチドを含む複製欠損組み換えウイルスに関する。そこで、本発明はさらにまたそのような発現ベクターを含む単離宿主細胞に関するが、このとき転写調節エレメントは宿主細胞内で機能性である。

【０１４４】

所望の遺伝子は、広い選択範囲内の発現ベクターのいずれかの中に挿入される。適切なベ

クターおよび細胞系の選択は、所望の産物の制約条件に依存する。典型的な発現ベクターはＳａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）に記載されている。適切な細胞系は、ＡＴＣＣのような受託機関から選択できる。その各々が参照してここに組み込まれる「細胞系およびハイブリドーマのＡＴＣＣカタログ（ＡＴＣＣ Ｃａｔａｌｏｇｕｅ ｏｆ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅｓ ａｎｄ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ）」（第６版）（１９８８）；「ＡＴＣＣ細胞系、ウイルス、および抗血清（ＡＴＣＣ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅｓ, Ｖｉｒｕｓｅｓ, ａｎｄ Ａｎｔｉｓｅｒａ）」を参照されたい。ベクターは、例えばＳａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）に記載されているような標準形質転換法またはトランスフェクション法によって所望の細胞へ導入される。

【０１４５】

融合タンパク質は、典型的には組み換え核酸法または合成ポリペプチド法のいずれかによって作製される。核酸操作の技術は、一般には例えば参照してここに組み込まれるＳａｍｂｒｏｏｋら（１９８９），「分子クローニング：実験マニュアル（第２版、第１～３巻）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｄ ｅｄ.）, Ｖｏｌｓ. １－３）」，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙに記載されている。ポリペプチドの合成方法は、例えばＭｅｒｒｉｆｉｅｌｄ, Ｊ. Ａｍｅｒ. Ｃｈｅｍ. Ｓｏｃ. ８５：２１４９－２１５６（１９６３）に記載されている。

【０１４６】

本発明の融合タンパク質を生成するために使用されるヌクレオチド配列は、天然もしくは合成配列に由来することができる。多くの天然遺伝子配列は、適切なプローブを使用してゲノムライブラリーからの様々なｃＤＮＡから入手できる。ＧｅｎＢａｎｋ（商標）、国立衛生研究所を参照されたい。コナジラミエクジソン受容体のための典型的プローブは、標準方法によって表１の配列から選択できる。適切な合成ＤＮＡフラグメントは、Ｂｅａｕｃａｇｅ ａｎｄ Ｃａｒｒｕｔｈｅｒｓ, Ｔｅｔｒａ. Ｌｅｔｔｓ. ２２：１８５９－１８６２（１９８１）によって記載されたホスホアミダイト法によって調製できる。二本鎖フラグメントは、その後相補的鎖を合成し、該鎖を適切な条件下で一緒にアニール化することによって、または適切なプライマー配列を備えるＤＮＡポリメラーゼを使用して相補的鎖を付加することによってのいずれかで入手されてよい。

【０１４７】

所望のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドフラグメントをコードする天然もしくは合成ポリヌクレオチドフラグメントは、インビトロで細胞培養において導入できる、またはインビトロで細胞培養において発現できる核酸構築体内に組み込まれるであろう。通常は、核酸構築体は酵母もしくは細菌のような単細胞宿主内での複製のために適切であろうが、さらにまたゲノムを用いて、および用いずに、並びにゲノム内に組み入れて、培養された哺乳動物もしくは植物またはその他の真核細胞系へ導入することも意図されてよい。細菌もしくは酵母内へ導入するために調製される核酸構築体には、典型的には宿主によって認識される複製系、所望の受容体ポリペプチドをコードする所定のＤＮＡフラグメント、該ポリペプチドコードセグメントへ機能的に連結した転写および翻訳開始調節配列ならびに該ポリペプチドコードセグメントへ機能的に連結した転写および翻訳終結調節配列が含まれる。転写調節配列には、典型的には該宿主によって認識される非相同エンハンサー、応答エレメント、またはプロモーターが含まれるであろう。適切なプロモーターの選択は宿主に依存するが、ｔｒｐ、ｌａｃおよびファージプロモーター、ｔＲＮＡプロモーターおよびグリコリティック酵素プロモーターのようなプロモーターが知られている。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）を参照。複製系ならびに転写および翻訳調節配列をステロイド受容体ＤＮＡ配列のための挿入部位と一緒に含む、簡便に入手できる発現ベクターを使用できる。細胞系と発現ベクターとの実行可能な組み合わせの例は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）に記載されている；さらにＭｅｔｚｇｅｒら（１９８８）, Ｎａｔｕｒｅ ３３４：３１－３６も参照されたい。

【０１４８】

特定の組み換えＤＮＡ分子が同定および単離されると、当技術分野において知られている数種の方法を使用して増殖させることができる。適切な宿主系および増殖条件が確立されると、組み換え発現ベクターを大量に増殖かつ調製することができる。上記で説明したように、使用できる発現ベクターには以下のベクターまたはそれらの誘導体が含まれるが、それらに限定されない：ほんの数例を挙げると、ワクシニアウイルスもしくはアデノウイルスのようなヒトもしくは動物ウイルス；バキュロウイルスのような昆虫ウイルス；酵母ベクター；バクテリオファージベクター（例、ラムダ）、およびプラスミドおよびコスミドＤＮＡベクター。

【０１４９】

さらに、挿入された配列の発現を変調する、または所望の特定方法で遺伝子産物を修飾および処理する宿主細胞株を選択することができる。様々な宿主細胞は、タンパク質の翻訳および翻訳後プロセシングならびに修飾のための特徴的および特異的機構を有している。発現した外来タンパク質の所望の修飾および処理を保証するために、適切な細胞系または宿主系を選択することができる。酵母内での発現は、生物学的活性産物を生成することができる。真核細胞内での発現は、「天然」折りたたみの可能性を増加させることができる。さらに、哺乳動物細胞内での発現は、コナジラミエクジソン受容体活性を再構成するため、または構成するためのツールを提供できる。さらに、様々なベクター／宿主発現系は、様々な程度にタンパク質分解開裂のようなプロセシング反応に影響を及ぼすことができる。

【０１５０】

ベクターは、例えばトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、ＤＥＡＥデキストラン、リン酸カルシウム沈降、リポフェクション（リソソーム融合）、粒子衝撃、遺伝子銃の使用、またはＤＮＡベクタートランスポーターのような当技術分野において知られている方法によって所望の宿主細胞内へ導入される（例えばＷｕら，１９９２，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：９６３－９６７；Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ，１９８８，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６３：１４６２１－１４６２４；および１９９０年３月１５日に出願されたＨａｒｔｍｕｔらのカナダ国特許出願第２，０１２，３１１号等を参照）。

【０１５１】

タンパク質の可溶性形態は、培養液を収集する、または洗剤を用いた処理によるように封入体を可溶化することによって、そして所望であれば超音波処理または上述したような他の機械的処理によって入手できる。可溶化もしくは可溶性タンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ＰＡＧＥ）、等電点電気泳動、二次元ゲル電気泳動、クロマトグラフィー（例、イオン交換、アフィニティ、イムノアフィニティ、およびサイズ排除カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ ｓｏｌｕｂｉｌｉｔｙ）、免疫沈降のような様々な方法を使用して、またはタンパク質精製のための他の標準方法によって単離できる。

【０１５２】

コナジラミエクジソン受容体ポリヌクレオチドを含むベクターおよび遺伝子発現カセット

そこで、本発明はさらにまた本発明によるコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターに関する。本発明はさらにまた、本発明によるコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子発現カセットに関する。ベクターまたは遺伝子発現カセットに適切に組み込まれている場合の本発明のポリヌクレオチド、およびそれらを含む組成物は、エクジソン受容体に基づく遺伝子発現系における遺伝子発現を調節するために有用である。それらは、いずれかのタイプの細胞もしくは組織中でインビトロまたはインビボでの遺伝子の導入および発現のために使用できる。形質転換は、さらにまた標的とすることができる（特定組織への導入は、特別にはベクターの選択、および特定プロモーターの選択による発現によって決定できる）。本発明のポリヌクレオチドおよびベクターは、有益にも当該ポリペプチドをインビボおよび細胞内で生成するために使用される。

【０１５３】
本発明のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、典型的にはプラスミドベクター内で使用される。好ましくは、発現制御配列は、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドを発現させるためにコナジラミエクジソン受容体ポリヌクレオチドコード配列へ機能的に連結されている。発現制御配列は、宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトさせることのできるベクター内のいずれかのエンハンサー、応答エレメント、プロモーター系であってよい。ベクターが適切な宿主内に組み込まれていると、宿主は、用途に依存して、該ポリヌクレオチドの高レベル発現のために適切な条件下で維持される。

【０１５４】
ポリヌクレオチドは、通常は該配列が発現制御配列へ機能的に連結（すなわち、機能を保証するように配置）された後に宿主内で発現する。これらの発現ベクターは、典型的には宿主染色体ＤＮＡのエピソームまたは組み込まれた部分としてのどちらかで宿主生物内で複製可能である。一般に、発現ベクターは、例えばテトラサイクリンもしくはネオマイシンのような、所望のＤＮＡ配列で形質転換されたそれらの細胞の検出を許容する選択マーカーを含む（例えば、参照してここに組み込まれる米国特許第４，７０４，３６２号を参照）。

【０１５５】
大腸菌は、本発明のポリヌクレオチドをクローン化するために有用な１つの原核細胞宿主である。その他の使用するために適切な微生物宿主には、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）のようなバシラス菌、およびサルモネラ菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、セラチア菌（Ｓｅｒｒａｔｉａ）のような腸内細菌、および様々なシュードモナス菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）が含まれる。

【０１５６】
酵母細胞、昆虫組織培養細胞、鳥細胞等のようなその他の真核細胞を使用できる。好ましくは、本発明のポリペプチドを生成するためには哺乳動物組織細胞培養が使用される（例えば、これにより参照して組み込まれるＷｉｎｎａｃｋｅｒ，「遺伝子からクローンへ（Ｆｒｏｍ Ｇｅｎｅｓ ｔｏ Ｃｌｏｎｅｓ），ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，ニューヨーク（１９８７）を参照）。酵母および哺乳動物細胞は、エクジソン受容体に対するリガンドへの応答性を付与する分子を自然状態では欠如しているため、コナジラミエクジソン受容体に基づく誘導遺伝子発現系を使用するために好ましい細胞である。

【０１５７】
発現ベクターは、さらにまた複製起点、プロモーター、エンハンサー、応答エレメント、ならびにリボソーム結合部位、ＲＮＡスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列のような必要なプロセシング情報部位のような発現制御配列を含んでいてよい。好ましくは、エンハンサーもしくはプロモーターは、ステロイド受容体をコードする遺伝子と自然に結び付いているものであるが、多くの場合に他のものが同等以上に適切であることが理解されるであろう。その他の好ましい発現制御配列は、ＳＶ４０、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス等のようなウイルス由来のエンハンサーもしくはプロモーターである。

【０１５８】
本発明のポリヌクレオチドを含むベクターは、細胞宿主のタイプに依存して変動するよく知られた方法によって宿主細胞内へ導入することができる。例えば、原核細胞のためには一般に塩化カルシウムトランスフェクションが利用されるが、他方他の細胞宿主のためにはリン酸カルシウム処理を使用できる。（例えば、参照してここに組み込まれるＳａｍｂｒｏｏｋら（１９８９），「分子クローニング：実験マニュアル（第２版）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｄ ｅｄ．）」，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙを参照。）用語「形質転換細胞」は、形質転換細胞の子孫も含むことが意図されている。

【０１５９】

必要な転写および翻訳シグナルは組み換え発現ベクター上に提供できる、またはそれらはコナジラミエクジソン受容体をコードする天然遺伝子および／またはそのフランキング領域によって提供されてもよい。潜在的宿主－ベクター系には、ウイルス（例、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等）により感染された哺乳動物細胞系；ウイルス（例、バキュロウイルス）により感染された昆虫細胞系；酵母ベクターを含有する酵母のような微生物；またはバクテリオファージ、ＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、もしくはコスミドＤＮＡを用いて形質転換された細菌が含まれるがそれらに限定されない。ベクターの発現エレメントは、それらの強度および特異性が様々である。利用された宿主－ベクター系に依存して、多数の適切な転写および翻訳エレメントのいずれか１つを使用できる。

【０１６０】

本発明の組み換えコナジラミエクジソン受容体タンパク質、またはその機能的フラグメント、誘導体、キメラ構築物、もしくはアナログは、組み換えによるコード配列の組み込み後に染色体上で発現できる。これに関連して、高レベルの安定な遺伝子発現を達成するためには多数の増幅系のいずれかを使用できる（Ｓａｍｂｒｏｏｋら，　１９８９，上記を参照）。

【０１６１】

コナジラミエクジソン受容体をコードするポリヌクレオチドを含む組み換えベクターが導入された細胞は、該細胞によるコナジラミエクジソン受容体の発現を提供する条件下の適切な細胞培養培地中で培養される。クローニングベクター内へのＤＮＡフラグメントの挿入について以前に記載されたいずれかの方法を使用すると、適切な転写／翻訳制御シグナルおよびタンパク質コード配列からなる遺伝子を含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、インビトロ組み換えＤＮＡおよび合成法ならびにインビボ組み換え法（遺伝的組み換え）が含まれてよい。

【０１６２】

コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、いずれかの調節領域、すなわち当技術分野において知られているプロモーター／エンハンサーエレメントへ機能的に連結して制御されてよいが、これらの調節エレメントは発現のために選択された宿主細胞内で機能的でなければならない。調節領域は、宿主細胞内での機能的転写のためのプロモーター領域、ならびに当該遺伝子の３’に位置し、そして転写終結のためのシグナルおよびポリアデニル化部位を規定する領域を含んでいてよい。これらのエレメント全部が発現カセットを構成する。

【０１６３】

本発明のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、５種の一般的アプローチによって同定できる：（ａ）所望のプラスミドＤＮＡもしくは特異的ｍＲＮＡのＰＣＲ増幅、（ｂ）核酸ハイブリダイゼーション、（ｃ）選択マーカー遺伝子機能の存在もしくは不在、（ｄ）適切な制限エンドヌクレアーゼを用いた分析、および（ｅ）挿入配列の発現。第１アプローチでは、核酸は増幅産物の検出を提供するためにＰＣＲによって増幅させることができる。第２アプローチでは、発現ベクター内に挿入された外来遺伝子の存在は、挿入マーカー遺伝子に相同である配列を含むプローブを使用した核酸ハイブリダイゼーションによって検出できる。第３アプローチでは、ベクター内の外来遺伝子の挿入によって惹起された組み換えベクター／宿主系は一定の「選択マーカー」遺伝子機能（例、β－ガラクトシダーゼ活性、チミジンキナーゼ活性、抗生物質に対する耐性、形質転換表現型、バキュロウイルス内での閉塞体形成等）の存在もしくは不在に基づいて同定および選択することができる。別の例では、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードする核酸がベクターの「選択マーカー」遺伝子配列内に挿入されると、コナジラミエクジソン受容体核酸インサートを含む組み換え体を該遺伝子機能の不在によって同定できる。第４アプローチでは、組み換え発現ベクターは適切な制限酵素を用いた消化によって同定される。第５アプローチでは、組み換え発現ベクターは、発現タンパク質が機能的活性な立体配座を保証することを条件に、組み換え体によって発現した遺伝子産物の活性、生化学的または免疫学的特徴をアッセイすることにより

同定できる。

【０１６４】

本発明のＤＮＡ配列を発現させる際には、極めて様々な宿主／発現ベクターの組み合わせを使用できる。有用な発現ベクターは、例えば染色体、非染色体および合成ＤＮＡ配列のセグメントから構成されてよい。適切なベクターには、ＳＶ４０の誘導体および細菌プラスミド、例えば大腸菌プラスミドのｃｏｌ　Ｅ１、ｐＣＲ１、ｐＢＲ３２２、ｐＭａ１－Ｃ２、ｐＥＴ、ｐＧＥＸ（Ｓｍｉｔｈら，　１９８８，　Ｇｅｎｅ　６７：３１－４０）、ｐＭＢ９並びにそれらの誘導体、ＲＰ４の様なプラスミド；例えばＮＭ９８９のような極めて多数のファージ１のようなファージＤＮＡ、ならびに例えばＭ１３および線維状一本鎖ファージＤＮＡのような他のファージＤＮＡ；２ｍプラスミドのような酵母プラスミドまたはそれらの誘導体；昆虫もしくは哺乳動物細胞内で有用なベクターのような真核細胞内で有用なベクター；ファージＤＮＡもしくはその他の発現制御配列を使用するために修飾されているプラスミドのようなプラスミドとファージＤＮＡとの組み合わせ由来のベクター等が含まれるがそれらに限定されない。

【０１６５】

本発明はさらにまた、宿主細胞内で発現することのできる遺伝子発現カセットに関するが、このとき該遺伝子発現カセットは本発明によるコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。そこで、本出願人らの発明はさらにまたエクジソン受容体に基づく遺伝子発現系において有用な新規遺伝子発現カセットを提供する。

【０１６６】

特定実施形態では、宿主細胞内で発現することのできる遺伝子発現カセットは、ａ）トランス活性化ドメイン、ＤＮＡ結合ドメイン、およびコナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインを含むポリペプチド；ｂ）ＤＮＡ結合ドメインおよびコナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインを含むポリペプチド；およびｃ）トランス活性化ドメインおよびコナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインを含むポリペプチドからなる群から選択されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

【０１６７】

また別の特定実施形態では、本発明は、宿主細胞内で発現することのできる遺伝子発現カセットを提供するが、このとき該遺伝子発現カセットは、ａ）トランス活性化ドメイン、ＤＮＡ結合ドメイン、およびコナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインを含むポリペプチド；ｂ）ＤＮＡ結合ドメインおよびコナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインを含むハイブリッドポリペプチド；およびｃ）トランス活性化ドメインおよびコナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインを含むポリペプチドからなる群から選択されたハイブリッドポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。本発明によるハイブリッドポリペプチドは少なくとも２つのポリペプチドフラグメントを含むが、このとき各ポリペプチドフラグメントは相違する起源、すなわち相違するポリペプチド、相違する核受容体、相違する種等からである。本発明によるハイブリッドポリペプチドは少なくとも２つのポリペプチドドメインを含んでいてよいが、このとき各ポリペプチドドメインは相違する起源からのものである。

【０１６８】

好ましくは、コナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインはコナジラミＢａｍｅｃｉａ　ａｒｇｅｎｔｉｆｏｌｉ　ＥｃＲ（「ＢａＥｃＲ」）からのものである。

【０１６９】

特定実施形態では、該コナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインは、配列番号：１、配列番号：１のヌクレオチド１０２～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド６７８～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド２５９～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド４５８～１３４９、および配列番号：１のヌクレオチド６４８～１３４９からなる群から選択された核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。

【０１７０】

特定実施形態では、該コナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインは、配列番号：

２、配列番号：２のアミノ酸１９３～４１６、配列番号：２のアミノ酸５３～４１６、配列番号：２のアミノ酸１１９～４１６、および配列番号：２のアミノ酸１８３～４１６からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む。

【０１７１】

ＤＮＡ結合ドメインは、合成およびキメラＤＮＡ結合ドメイン、またはそれらのアナログ、組み合わせもしくは修飾を含む、知られている応答エレメントを備えるいずれかのＤＮＡ結合ドメインであってよい。このましくは、ＤＢＤは、ＧＡＬ４　ＤＢＤ、ＬｅｘＡ　ＤＢＤ、転写因子ＤＢＤ、ＥｃＲ　ＤＢＤのようなステロイド／甲状腺ホルモン核受容体スーパーファミリーメンバーＤＢＤまたは細菌ＬａｃＺ　ＤＢＤである。

【０１７２】

トランス活性化ドメイン（「ＡＤ」もしくは「ＴＡ」と略記）は、いずれかのステロイド／甲状腺ホルモン核受容体ＡＤ、合成もしくはキメラＡＤ、ポリグルタミンＡＤ、塩基性もしくは酸性アミノ酸ＡＤ、ＶＰ１６　ＡＤ、ＧＡＬ４　ＡＤ、ＮＦ－κＢ　ＡＤ、ＢＰ６４　ＡＤ、Ｂ４２酸性活性化ドメイン（Ｂ４２ＡＤ）、ｐ６５トランス活性化ドメイン（ｐ６５ＡＤ）、またはそれらのアナログ、組み合わせ、もしくは修飾であってよい。特定実施形態では、ＡＤは合成もしくはキメラＡＤである、またはＥｃＲ、グルココルチコイド受容体、ＶＰ１６、ＧＡＬ４、ＮＦ－κＢ、またはＢ４２酸性活性化ドメインＡＤから入手される。

【０１７３】

特定実施形態では、該遺伝子発現カセットはａ）ＤＮＡ結合ドメイン、またはｂ）トランス活性化ドメインのどちらかと；および本発明によるＢａＥｃＲリガンド結合ドメインとを含むハイブリッドポリペプチドをコードする。

【０１７４】

本発明は、さらにまた：ｉ）ＤＮＡ結合ドメインを含むポリペプチドによって認識されるドメインを含む応答エレメントと；ｉｉ）トランス活性化ドメインを含むポリペプチドによって活性化されるプロモーターと；およびｉｉｉ）その発現が変調されるべき遺伝子と、を含む遺伝子発現カセットも提供する。

【０１７５】

応答エレメント（「ＲＥ」）は、知られているＤＮＡ結合ドメイン、またはそれらのアナログ、組み合わせ、もしくは修飾を備えるいずれかの応答エレメントであってよい。本発明では単一ＲＥを使用できる、または同一ＲＥの多重コピーまたは２つ以上の相違するＲＥのいずれかである多重ＲＥを使用できる。特定実施形態では、ＲＥはＧＡＬ４（「ＧＡＬ４ＲＥ」）、ＬｅｘＡ、エクジソン応答エレメント（ＥｃＲＥ）のようなステロイド／甲状腺ホルモン核受容体ＲＥ、または合成ＤＮＡ結合ドメインを認識する合成ＲＥである。

【０１７６】

本発明によるステロイド／甲状腺ホルモン核受容体ＤＮＡ結合ドメイン、活性化ドメインまたは応答エレメントは、エクジソン受容体（ＥｃＲ）、ユビキタス受容体（ＵＲ）、オーファン受容体１（ＯＲ－１）、ステロイドホルモン核受容体１（ＮＥＲ－１）、ＲＸＲ相互作用タンパク質－１５（ＲＩＰ－１５）、肝臓ｘ受容体β（ＬＸＲβ）、ステロイドホルモン受容体様タンパク質（ＲＬＤ－１）、肝臓ｘ受容体（ＬＸＲ）、肝臓ｘ受容体α（ＬＸＲα）、ファルネソイドｘ受容体（ＦＸＲ）、受容体相互作用タンパク質１４（ＲＩＰ－１４）、ファルネソール受容体（ＨＲＲ－１）、甲状腺ホルモン受容体α（ＴＲα）、甲状腺ホルモン受容体１（ｃ－ｅｒｂＡ－１）、甲状腺ホルモン受容体β（ＴＲβ）、レチノイン酸受容体α（ＲＡＲα）、レチノイン酸受容体β（ＲＡＲβ，ＨＡＰ）、レチノイン酸受容体γ（ＲＡＲγ）、レチノイン酸受容体γ様（ＲＡＲＤ）、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体α（ＰＰＡＲα）、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体β（ＰＰＡＲβ）、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体δ（ＰＰＡＲδ，ＮＵＣ－１）、ペルオキシソーム増殖因子活性化因子関連受容体（ＦＡＲ）、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ（ＰＰＡＲγ）、甲状腺ホルモン受容体αの非コード鎖によってコー

ドされたオーファン受容体（ＲＥＶＥＲＢα）、ｖ－ｅｒｂ　Ａ関連受容体（ＥＡＲ－１）、ｖ－ｅｒｂ関連受容体（ＥＡＲ－ｌＡ），γ）、甲状腺ホルモン受容体βの非コード鎖によってコードされたオーファン受容体（ＲＥＶＥＲＢβ）、ｖ－ｅｒｂ関連受容体（ＥＡＲ－１β）、オーファン核受容体ＢＤ７３（ＢＤ７３）、ｒｅｖ－ｅｒｂＡ関連受容体（ＲＶＲ）、亜鉛フィンガータンパク質１２６（ＨＺＦ２）、エクジソン誘導タンパク質Ｅ７５（Ｅ７５）、エクジソン誘導タンパク質Ｅ７８（Ｅ７８）、ショウジョウバエ受容体７８（ＤＲ－７８）、レチノイド関連オーファン受容体α（ＲＯＲα）、レチノイドＺ受容体α（ＲＺＲα）、レチノイド関連オーファン受容体β（ＲＯＲβ）、レチノイドＺ受容体β（ＲＺＲβ）、レチノイド関連オーファン受容体γ（ＲＯＲγ）、レチノイドＺ受容体γ（ＲＺＲγ）、レチノイド関連オーファン受容体（ＴＯＲ）、ホルモン受容体３（ＨＲ－３）、ショウジョウバエホルモン受容体３（ＤＨＲ－３）、スズメガホルモン受容体３（ＭＨＲ－３）、Ｇａｌｌａｒｉａホルモン受容体３（ＧＨＲ－３）、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ核受容体３（ＣＮＲ－３）、ハマキガホルモン受容体３（ＣＨＲ－３）、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ核受容体１４（ＣＮＲ－１４）、ビタミンＤ受容体（ＶＤＲ）、オーファン核受容体（ＯＮＲ－１）、プレグナンＸ受容体（ＰＸＲ）、ステロイドおよび生体異物受容体（ＳＸＲ）、安息香酸塩Ｘ受容体（ＢＸＲ）、核受容体（ＭＢ－６７）、構成性アンドロスタン受容体１（ＣＡＲ－１）、構成性アンドロスタン受容体α（ＣＡＲα）、構成性アンドロスタン受容体２（ＣＡＲ－２）、構成性アンドロスタン受容体β（ＣＡＲβ）、ショウジョウバエホルモン受容体９６（ＤＨＲ－９６）、核ホルモン受容体１（ＮＨＲ－１）、肝細胞核因子４（ＨＮＦ－４）、肝細胞核因子４Ｇ（ＨＮＦ－４Ｇ）、肝細胞核因子４Ｂ（ＨＮＦ－４Ｂ）、肝細胞核因子４Ｄ（ＨＮＦ－４Ｄ，ＤＨＮＦ－４）、レチノイドＸ受容体α（ＲＸＲα）、レチノイドＸ受容体β（ＲＸＲβ）、Ｈ－２領域ＩＩ結合タンパク質（Ｈ－２ＲＩＩＢＰ）、核受容体コレギュレーター－１（ＲＣｏＲ－１）、レチノイドＸ受容体γ（ＲＸＲγ）、ウルトラスピラクル（ＵＳＰ）、２Ｃ１核受容体、絨毛膜因子１（ＣＦ－１）、精巣受容体２（ＴＲ－２）、精巣受容体２－１１（ＴＲ２－１１）、精巣受容体４（ＴＲ４）、ＴＡＫ－１、ショウジョウバエホルモン受容体（ＤＨＲ７８）、Ｔａｉｌｌｅｓｓ（ＴＬＬ）、ｔａｉｌｌｅｓｓホモログ（ＴＬＸ）、ＸＴＬＬ、ニワトリオボアルブミン上流プロモーター転写因子Ｉ（ＣＯＵＰ－ＴＦＩ）、ニワトリオボアルブミン上流プロモーター転写因子Ａ（ＣＯＵＰ－ＴＦＡ）、ＥＡＲ－３、ＳＶＰ－４４、ニワトリオボアルブミン上流プロモーター転写因子ＩＩ（ＣＯＵＰ－ＴＦＩＩ）、ニワトリオボアルブミン上流プロモーター転写因子Ｂ（ＣＯＵＰ－ＴＦＢ）、ＡＲＰ－１、ＳＶＰ－４０、ＳＶＰ、ニワトリオボアルブミン上流プロモーター転写因子ＩＩＩ（ＣＯＵＰ－ＴＦＩＩＩ）、ニワトリオボアルブミン上流プロモーター転写因子Ｇ（ＣＯＵＰ－ＴＦＧ）、ＳＶＰ－４６、ＥＡＲ－２、エストロゲン受容体α（ＥＲα）、エストロゲン受容体β（ＥＲβ）、エストロゲン関連受容体１（ＥＲＲ１）、エストロゲン関連受容体α（ＥＲＲα）、エストロゲン関連受容体２（ＥＲＲ２）、エストロゲン関連受容体β（ＥＲＲβ）、グルココルチコイド受容体（ＧＲ）、ミネラルコルチコイド受容体（ＭＲ）、プロゲステロン受容体（ＰＲ）、アンドロゲン受容体（ＡＲ）、神経成長因子誘発遺伝子Ｂ（ＮＧＦＩ－Ｂ）、Ｎｕｒ－７７に類似する核受容体（ＴＲＳ）、Ｎ１０、オーファン受容体（ＮＵＲ－７７）、ヒト初期応答遺伝子（ＮＡＫ－１）、Ｎｕｒｒ関連因子１（ＮＵＲＲ－１）、ヒト前初期応答遺伝子（ＮＯＴ）、再生肝核受容体１（ＲＮＲ－１）、造血性亜鉛フィンガー３（ＨＺＦ－３）、Ｎｕｒ関連タンパク質－１（ＴＩＮＯＲ）、核オーファン受容体１（ＮＯＲ－１）、ＮＯＲ１関連受容体（ＭＩＮＯＲ）、ショウジョウバエホルモン受容体３８（ＤＨＲ－３８）、Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ核受容体８（ＣＮＲ－８）、Ｃ４８Ｄ５、ステロイド産生因子１（ＳＦ１）、エンドゼピン様ペプチド（ＥＬＰ）、ｆｕｓｈｉ　ｔａｒａｚｕ因子１（ＦＴＺ－Ｆ１）、副腎４結合タンパク質（ＡＤ４ＢＰ）、肝受容体ホモログ（ＬＲＨ－１）、Ｆｔｚ－Ｆｌ－関連オーファン受容体Ａ（ｘＦＦｒＡ）、Ｆｔｚ－Ｆｌ－関連オーファン受容体Ｂ（ｘＦＦｒＢ）、ＬＲＨ－１関連核受容体（ＦＦＬＲ）、ＬＲＨ－１関連核受容体（ＰＨＲ）、フェトプロテイン転写因子（ＦＴＦ）、生殖細胞核因子（ＧＣＮＦＭ）、レチノイド受容体関連精巣関連受容体（

ＲＴＲ）、クニルプス（ｋｎｉｒｐｓ）（ＫＮＩ）、クニルプス関連性（ＫＮＲＬ）、胚性腺（ＥＧＯＮ）、リガンド依存性核受容体のためのショウジョウバエ遺伝子（ＥＡＧＬＥ）、トリソラックス（ｔｒｉｔｈｏｒａｘ）に類似する核受容体（ＯＤＲ７）、トリソラックス、用量感受性性転換副腎形成不全性先天性危険域染色体Ｘ遺伝子（ＤＡＸ－１）、先天性副腎形成不全性および下垂体性機能不全性腺機能低下症（ＡＨＣＨ）、および短ヘテロダイマーパートナー（ＳＨＰ）からなる群から選択されたステロイド／甲状腺ホルモン核受容体から入手できる。

【０１７７】

本発明のために、核受容体およびコナジラミエクジソン受容体にはさらに合成およびキメラ核受容体ならびにコナジラミエクジソン受容体およびそれらのホモログが含まれる。

【０１７８】

コナジラミエクジソン受容体に対する抗体

本発明によると、組み換えまたは化学合成によって生成したコナジラミエクジソン受容体ポリペプチド、およびそのフラグメントまたは融合タンパク質を含むその他の誘導体もしくはアナログは、抗体を生成するための抗原もしくは免疫原として使用できる。好ましくは、該抗体は詳細には同翅目エクジソン受容体ポリペプチドには結合するが、他のエクジソン受容体ポリペプチドには結合しない。より好ましくは、該抗体は詳細にはコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドには結合するが、他のエクジソン受容体ポリペプチドには結合しない。

【０１７９】

本発明はさらにまた、抗原性ペプチドおよびそれらに対する抗体に関する。より特別には、本発明は本発明によるコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドのフラグメントを含む抗原性ペプチドに関するが、このとき該フラグメントは：

（ａ）配列番号：１のヌクレオチド１０２～２５８、配列番号：１のヌクレオチド２５９～４５７、配列番号：１のヌクレオチド４５８～６７７、配列番号：１のヌクレオチド６７８～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド２５９～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド４５８～１３４９、および配列番号：１のヌクレオチド６４８～１３４９からなる群から選択された核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる；

（ｂ）配列番号：２のアミノ酸１～５２、配列番号：２のアミノ酸５３～１１８、配列番号：２のアミノ酸１１９～１９２、配列番号：２のアミノ酸１９３～４１６、配列番号：２のアミノ酸５３～４１６、配列番号：２のアミノ酸１１９～４１６、および配列番号：２のアミノ酸１８３～４１６からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む；および、

（ｃ）詳細には、配列番号：２、配列番号：２のアミノ酸１～５２、配列番号：２のアミノ酸５３～１１８、配列番号：２のアミノ酸１１９～１９２、配列番号：２のアミノ酸１９３～４１６、配列番号：２のアミノ酸５３～４１６、配列番号：２のアミノ酸１１９～４１６、および配列番号：２のアミノ酸１８３～４１６からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチド内のエピトープに対して生成された抗体に結合する、からなる群から選択された特性を有する。

【０１８０】

また別の実施形態では、本発明は詳細には上記のような本発明によるコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドのフラグメントを含む抗原性ペプチドに結合する抗体に関する。該抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってよく、インビトロまたはインビボ法で生成することができる。

【０１８１】

本発明の抗体は、特定の同翅目エクジソン受容体へ結合するための特異性を有する。そこで、これらもしくは相同ポリペプチドの定性的もしくは定量的存在を決定するための試薬を生成することができる。あるいはまた、これらの抗体を使用すると受容体ポリペプチドを分離または精製することができる。

【０１８２】

ポリクローナル抗体を生成するためには、適切な標的免疫系、典型的にはマウスまたはウ

サギが選択される。実質的精製抗原は、該動物に適した方法および免疫学者にはよく知られている他のパラメーターによって決定される方法で免疫系に提示される。典型的な注射部位は、足蹠内、筋肉内、腹腔内、または皮内である。当然ながら、マウスまたはウサギを他の種と取り換えてもよい。

【０１８３】

免疫学的応答は、通常はイムノアッセイを用いてアッセイされる。通常は、そのようなイムノアッセイは例えば該抗原が生成した場合と同一細胞によって、そして同一方法で生成した抗原源の精製を含んでいる。イムノアッセイは、ラジオイムノアッセイ、酵素結合アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、蛍光アッセイ、または多数のその他の選択のいずれかであってよく、それらの大多数は機能的に同等であるが、特異的条件下では長所を示す可能性がある。

【０１８４】

高親和性を備えるモノクローナル抗体は、典型的には参照してここに組み込まれる例えばＨａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（１９８８），「抗体：実験マニュアル（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）」，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ；またはＧｏｄｉｎｇ（１９８６），「モノクローナル抗体：原理および実践第２版（Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ（２ｄ ｅｄ））、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ニューヨークに記載されているような標準方法によって作製される。手短には、適切な動物が選択され、所望の免疫プロトコールに従われる。適切な期間後、このような動物の脾臓が切除され、個々の脾臓細胞は、典型的には適切な選択条件下で不死化骨髄腫細胞へ融合させられる。その後、細胞はクローン的に分離され、各クローンの上清は該抗原の所望領域に対して特異的である適切な抗体の生成について試験される。

【０１８５】

その他の適切な方法には、抗原性ポリペプチドへの、またはファージもしくは類似ベクターにおける広範囲の抗体ライブラリーへのリンパ球のインビトロ曝露が含まれる。参照してここに組み込まれるＨｕｓｅら（１９８９）「ファージラムダにおける免疫グロブリンレパートリーの大規模コンビナトリアルライブラリーの生成（Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ａ Ｌａｒｇｅ Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ Ｒｅｐｅｒｔｏｉｒｅ ｉｎ Ｐｈａｇｅ Ｌａｍｂｄａ）」，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５－１２８１を参照。

【０１８６】

本発明のポリペプチドおよび抗体は、修飾して、または修飾せずに使用できる。多くの場合、該ポリペプチドおよび抗体は検出可能なシグナルを提供する物質を共有的または非共有的に結合することによって標識される。極めて様々な標識および共役結合法は知られており、科学文献および特許文献の両方に広く報告されている。適切な標識には、放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害剤、蛍光剤、化学ルミネセンス、磁性粒子等が含まれる。このような標識の使用を教示している特許には、米国特許第３，８１７，８３７号；第３，８５０，７５２号；第３，９３９，３５０号；第３，９９６，３４５号；第４，２７７，４３７号；第４，２７５，１４９号；および第４，３６６，２４１号が含まれる。さらに、組み換え免疫グロブリンを生成できるが、Ｃａｂｉｌｌｙの米国特許第４，８１６，５６７号を参照されたい。

【０１８７】

分子は、特別には例えば免疫グロブリン（抗体）もしくはＴ細胞抗原受容体のような免疫系の抗原認識分子と相互作用できる場合は「抗原性」である。抗原性ポリペプチドは、少なくとも約５、および好ましくは少なくとも約１０アミノ酸を含有している。分子の抗原性部分は抗体もしくはＴ細胞受容体認識に対して免疫優性である部分であってよく、または該抗原性部分を免疫のための担体分子へ結合させることによって該分子に対する抗体を生成するために使用される部分であってよい。抗原性である分子は、それ自体が免疫原性である、すなわち、担体を使用せずに免疫応答を引き出すことができる必要はない。

【０１８８】
このような抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一本鎖、Ｆａｂフラグメントおよびｆａｂ発現ライブラリーが含まれるがそれらに限定されない。本発明の抗コナジラミエクジソン受容体抗体は、例えば相違する種からのコナジラミエクジソン受容体を認識できるように、交差反応性であってよい。ポリクローナル抗体は、より大きな交差反応性の可能性を有する。あるいはまた、本発明の抗体は例えばコナジラミエクジソン受容体のような単一形のコナジラミエクジソン受容体に対して特異的であってよい。好ましくは、このような抗体はコナジラミエクジソン受容体に対して特異的である。
【０１８９】
当技術において知られている様々な方法を使用すると、ポリクローナル抗体を生成することができる。抗体を生成するために、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ等を含むがそれらに限定されない様々な宿主動物は、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチド、またはその誘導体（フラグメント、若しくは融合タンパク質）を用いた注射によって免役することができる。１つの実施形態では、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドまたはそのフラグメントは、例えばウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）またはキーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）のような免疫原性担体へ結合させることができる。免疫応答を増加させるためには、宿主種に依存して、フロインド（完全および不完全）、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノールのようなアジュバント、ならびに例えばＢＣＧ（カルメット－ゲラン桿菌：ｂａｃｉｌｌｅ Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ）およびコリネバクテリウム・パルブム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒｖｕｍ）のような潜在的に有用なヒトアジュバントを使用できる。
【０１９０】
コナジラミエクジソン受容体ポリペプチド、またはそのフラグメント、アナログ、もしくは誘導体に向けられたモノクローナル抗体を調製するためには、培養中で連続細胞系による抗体分子の生成を提供するいずれかの方法を使用できる。これらには最初にＫｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎによって開発されたハイブリドーマ法［Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－４９７（１９７５）］、ならびにトリオーマ法、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ法［Ｋｏｚｂｏｒら，Ｉｍｍｎｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ４：７２ １９８３）；Ｃｏｔｅら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８０：２０２６－２０３０（１９８３）］、およびヒトモノクローナル抗体を生成するためのＥＢＶ－ハイブリドーマ法［Ｃｏｌｅら ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，ｐｐ．７７－９６（１９８５）］が含まれるがそれらに限定されない。本発明の追加の実施形態では、モノクローナル抗体は無菌動物中で生成することができる［１９８９年１２月２８日に公表された国際特許公開第ＷＯ８９／１２６９０号］。実際に、本発明によると、適切な生物学的活性を有するヒト抗体分子からの遺伝子と一緒にコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドに対して特異的であるマウス抗体分子からの遺伝子をスプライシングすることによる「キメラ抗体」の生成のために開発された方法［Ｍｏｒｒｉｓｏｎら，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１５９：８７０（１９８４）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら，Ｎａｔｕｒｅ ３１２：６０４－６０８（１９８４）；Ｔａｋｅｄａら，Ｎａｔｕｒｅ ３１４：４５２－４５４（１９８５）］を使用できる；このような抗体は本発明の範囲内に含まれる。このようなヒトもしくはヒト化キメラ抗体はヒトの疾患もしくは障害（以下で記載する）の治療に使用するために好ましいが、それはヒトもしくはヒト化抗体は、外因性抗体に比較して免疫応答、特にアレルギー反応を誘発することがはるかに少ないと思われるからである。
【０１９１】
本発明によると、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）抗体の生成のために記載された方法［Ｈｕｓｔｏｎへの米国特許第５，４７６，７８６号および第５，１３２，４０５号；米国特許第４

，９４６，７７８号］は、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチド特異的一本鎖抗体を生成するために適合させることができる。本発明の追加の実施形態は、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチド、またはその誘導体もしくはアナログに対して所望の特異性を備えるモノクローナルＦａｂフラグメントの迅速かつ容易な同定を許容するＦａｂ発現ライブラリーを構築するために記載された方法［Ｈｕｓｅら，　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４６：１２７５－１２８１（１９８９）］を利用する。

【０１９２】

該抗体分子のイディオタイプを含有する抗体フラグメントは、知られている方法によって生成できる。例えば、そのようなフラグメントには以下のものが含まれるがそれらに限定されない：該抗体分子のペプシン消化によって生成できるＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント；Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントのジスルフィド架橋を還元させることによって生成できるＦａｂ’フラグメント、および該抗体分子をパパインおよび還元剤により処理することによって生成できるＦａｂフラグメント。

【０１９３】

抗体の生成においては、所望の抗体のスクリーニングは、例えばラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着剤アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイチューイムノアッセイ（例えばコロイド状金、酵素もしくは放射性同位体標識）、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ（例、ゲル凝集アッセイ、赤血球凝集アッセイ）、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、タンパク質Ａアッセイ、および免疫電気泳動アッセイ等のような当技術分野において知られている方法によって遂行できる。１つの実施形態では、抗体結合は一次抗体上の標識を検出することによって検出される。別の実施形態では、一次抗体は一次抗体への二次抗体または試薬の結合を検出することによって検出される。さらに別の実施形態では、二次抗体が標識される。イムノアッセイにおける結合を検出するためには多数の手段が当技術分野において知られており、本発明の範囲内に含まれる。例えば、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドの特異的エピトープを認識する抗体を選択するためには、そのようなエピトープを含有するコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドフラグメントに結合する産物に対して生成したハイブリドーマをアッセイすることができる。特定種の動物からのコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドに対して特異的である抗体を選択するためには、その動物種の細胞により発現した、またはそれから単離されたコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドとの陽性結合に基づいて選択できる。

【０１９４】

上記の抗体は、例えばウェスタンブロット、インサイチューでのコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドのイメージング、適切な生理学的サンプル中でのそれらのレベルの測定等のようなコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドの局在位置および活性に関連する当技術分野において知られている方法で、上記または当技術分野において知られている検出方法のいずれかを使用して使用できる。

【０１９５】

特定実施形態では、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドの活性を作動または拮抗する抗体を生成することができる。このような抗体は、リガンドを同定するために下記に記載するアッセイを使用して試験できる。特別には、このような抗体は細胞内で発現したｓｃＦｖ抗体であってよい。

【０１９６】

本発明の新規ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用

本発明はさらに、本発明のコナジラミエクジソン受容体ポリヌクレオチドおよびそれらがコードするポリペプチドに対する多数の使用を提供する。

【０１９７】

本発明のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドには様々な有用性がある。例えば、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、エクジソン受容体に基づく遺伝子発現系における遺伝子発現を変調する方法において有用である。さらにまた、本発明のポリペプ

チドのリガンド結合ドメインへの結合に対して特異的であるリガンドを同定および選択するための方法、リガンド結合ドメインへの特異的結合を示す化合物を同定および選択するための方法、および昆虫生理または発達を変調（例、殺滅）するための方法が含まれる。

【０１９８】

遺伝子発現を変調する方法

ここに提示したように、本出願人らの新規ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、原核および真核宿主細胞の両方において調節可能な遺伝子発現系を提供するためのエクジソン受容体に基づく遺伝子発現系において有用である。そこで、本発明はさらにまたエクジソン受容体に基づく遺伝子発現系における本発明の新規コナジラミエクジソン受容体ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用、およびそのようなエクジソン受容体に基づく遺伝子発現系を使用して宿主細胞内の遺伝子発現を変調する方法に関する。

【０１９９】

この遺伝子発現系は、その中でトランス活性化ドメイン、ＤＮＡ結合ドメインおよびリガンド結合ドメインが１つのコードされたポリペプチド上にある「シングルスイッチ」に基づく遺伝子発現系であってよい。あるいはまた、該遺伝子発現変調系は、その中でトランス活性化ドメインおよびＤＮＡ結合ドメインが２つの相違するコードされたポリペプチド上にある「デュアルスイッチ」または「ツーハイブリッド」に基づく遺伝子発現変調系であってよい。本出願人らは、本発明のコナジラミエクジソン受容体ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは宿主細胞内での遺伝子発現を変調するためにエクジソン受容体に基づく遺伝子発現系の構成要素として使用できることを初めて証明した。

【０２００】

特別には、本発明は、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞内で発現することのできる少なくとも１つの遺伝子発現カセットを含む遺伝子発現変調系に関する。好ましくは、該コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドは、配列番号：２、配列番号：２のアミノ酸１～５２、配列番号：２のアミノ酸５３～１１８、配列番号：２のアミノ酸１１９～１９２、配列番号：２のアミノ酸１９３～４１６、配列番号：２のアミノ酸５３～４１６、配列番号：２のアミノ酸１１９～４１６、および配列番号：２のアミノ酸１８３～４１６からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む。より好ましくは、該コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドは配列番号：２のアミノ酸１９３～４１６、配列番号：２のアミノ酸５３～４１６、配列番号：２のアミノ酸１１９～４１６、または配列番号：２のアミノ酸１８３～４１６を含む。

【０２０１】

特定実施形態では、該遺伝子発現変調系は、トランス活性化ドメイン、その発現が変調されるべき遺伝子と関連する応答エレメントを認識するＤＮＡ結合ドメイン、およびコナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメイン（ここでは「ＢａＥｃＲ　ＬＢＤ」と称する）を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子発現カセットを含む。該遺伝子発現変調系はさらにまた：ｉ）第１遺伝子発現カセットのコードされたポリペプチドのＤＮＡ結合ドメインによって認識される応答エレメントと；ｉｉ）第１遺伝子発現カセットのコードされたポリペプチドのトランス活性化ドメインによって活性化されるプロモーターと；およびｉｉｉ）その発現が変調されるべき遺伝子と、を含む第２遺伝子発現カセットを含んでいてよい。

【０２０２】

別の特定実施形態では、該遺伝子発現変調系は、ａ）トランス活性化ドメイン、その発現が変調されるべき遺伝子と関連する応答エレメントを認識するＤＮＡ結合ドメイン、およびＢａＥｃＲ　ＬＢＤを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、およびｂ）脊椎動物レチノイドＸ受容体リガンド結合ドメイン、無脊椎動物レチノイドＸ受容体リガンド結合ドメイン、ウルトラスピラクルタンパク質リガンド結合ドメイン、および２つのポリペプチドフラグメントを含むキメラリガンド結合ドメインからなる群から選択された第２核受容体リガンド結合ドメインとを含む遺伝子発現カセットを含むが、このとき第１ポリペプチドフラグメントは脊椎動物レチノイドＸ受容体リガンド結合ドメイン、無脊椎

動物レチノイドＸ受容体リガンド結合ドメインまたはウルトラスピラクルタンパク質リガンド結合ドメインからであり、そして第２ポリペプチドフラグメントは相違する脊椎動物レチノイドＸ受容体リガンド結合ドメイン、無脊椎動物レチノイドＸ受容体リガンド結合ドメインまたはウルトラスピラクルタンパク質リガンド結合ドメインからである。該遺伝子発現変調系はさらにまた：ｉ）第１遺伝子発現カセットのコードされたポリペプチドのＤＮＡ結合ドメインによって認識される応答エレメントと；ｉｉ）第１遺伝子発現カセットのコードされたポリペプチドのトランス活性化ドメインによって活性化されるプロモーターと；およびｉｉｉ）その発現が変調されるべき遺伝子と、を含む第２遺伝子発現カセットを含んでいてよい。

【０２０３】

また別の特定実施形態では、該遺伝子発現変調系は、その発現が変調されるべき遺伝子と関連する応答エレメントを認識するＤＮＡ結合ドメインおよび核受容体リガンド結合ドメインを含む第１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む第１遺伝子発現カセットと、およびトランス活性化ドメインおよび核受容体リガンド結合ドメインを含む第２ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む第２遺伝子発現カセットとを含むが、このとき該核受容体リガンド結合ドメインの１つはＢａＥｃＲ　ＬＢＤである。好ましい実施形態では、第１ポリペプチドはトランス活性化ドメインを実質的に含んでおらず、第２ポリペプチドはＤＮＡ結合ドメインを実質的に含まない。本発明のために、「ＤＮＡ結合ドメインを実質的に含まない」とは、問題のタンパク質が活性化もしくは結合活性を提供するために十分な問題のドメインの配列を含有していないことを意味する。該遺伝子発現変調系はさらにまた：ｉ）第１遺伝子発現カセットの第１ポリペプチドのＤＮＡ結合ドメインによって認識される応答エレメントと；ｉｉ）第２遺伝子発現カセットの第２ポリペプチドのトランス活性化ドメインによって活性化されるプロモーターと；およびｉｉｉ）その発現が変調されるべき遺伝子と、を含む第３遺伝子発現カセットを含んでいてよい。

【０２０４】

このとき１つの核受容体リガンド結合ドメインだけがＢａＥｃＲ　ＬＢＤである場合は、もう１つの核受容体リガンド結合ドメインはＢａＥｃＲ　ＬＢＤと一緒にダイマーを形成するいずれか他の核受容体からのものであってよい。例えば、他方の核受容体リガンド結合ドメイン（「パートナー」）は他のエクジソン受容体、脊椎動物レチノイドＸ受容体（ＲＸＲ）、無脊椎動物ＲＸＲ、ウルトラスピラクルタンパク質（ＵＳＰ）、または脊椎動物ＲＸＲ、無脊椎動物ＲＸＲ、およびＵＳＰからなる群から選択される少なくとも２つの相違する核受容体リガンド結合ドメインポリペプチドフラグメントを含むキメラ核受容体からのものであってよい（これにより参照してその全体が組み込まれる同時係属出願の国際公開特許第ＰＣＴ／ＵＳ０１／０９０５０号、米国特許第６０／２９４，８１４号、および米国特許第６０／２９４，８１９号を参照）。「パートナー」核受容体リガンド結合ドメインは、さらにトランケーション突然変異、欠失突然変異、置換突然変異、または他の修飾を含んでいてよい。

【０２０５】

特定実施形態では、該コナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインは、配列番号：２、配列番号：２のアミノ酸１９３～４１６、配列番号：２のアミノ酸５３～４１６、配列番号：２のアミノ酸１１９～４１６、および配列番号：２のアミノ酸１８３～４１６からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む。また別の実施形態では、該コナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメインは、配列番号：１、配列番号：１のヌクレオチド１０２～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド６７８～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド２５９～１３４９、配列番号：１のヌクレオチド４５８～１３４９、および配列番号：１のヌクレオチド６４８～１３４９からなる群から選択された核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる。

【０２０６】

特定実施形態では、その発現が変調されるべき遺伝子は宿主細胞に関して相同遺伝子である。また別の特定実施形態では、その発現が変調されるべき遺伝子は宿主細胞に関して非

相同遺伝子である。

【０２０７】

遺伝子発現を変調させる方法で使用するためのリガンドは下記に記載されており、１つ以上の核受容体のリガンド結合ドメインと結合されると、これは次に遺伝子に連結した応答エレメントに結合され、該遺伝子の発現を外部から時間的に調節するための手段を提供する。本発明の様々な構成要素が相互に結合する、すなわち例えばリガンドとリガンド結合ドメイン、ＤＮＡ結合ドメインと応答エレメント、トランス活性化ドメインとプロモーター等の結合機構または順序は、決定的に重要ではない。

【０２０８】

そこで、本出願人らの発明は、本発明によるコナジラミエクジソン受容体を使用して宿主細胞内の遺伝子発現を変調する方法において有用である。詳細には、本出願人らの発明は、宿主細胞内の遺伝子発現を変調する方法であって：ａ）宿主細胞内へ本発明によるコナジラミエクジソン受容体を含むエクジソン受容体に基づく遺伝子発現系を導入するステップと；およびｂ）宿主細胞内へリガンドを導入するステップと、を含む方法を提供するが、このとき変調されるべき遺伝子は：ｉ）該遺伝子発現系のＤＮＡ結合ドメインによって認識されるドメインを含む応答エレメントと；ｉｉ）該遺伝子発現系のトランス活性化ドメインによって活性化されるプロモーターと；およびｉｉｉ）その発現が変調されるべき遺伝子であって、リガンドが宿主細胞内へ導入されると該遺伝子の発現が変調される遺伝子と、を含む遺伝子発現カセットの構成要素である。

【０２０９】

本発明は、宿主細胞内の遺伝子発現を変調するための方法であって：ａ）宿主細胞内へ本発明によるコナジラミエクジソン受容体を含むエクジソン受容体に基づく遺伝子発現変調系を導入するステップと；ｂ）宿主細胞内へ遺伝子発現カセットを導入するステップであって、このとき該遺伝子発現カセットは、ｉ）該遺伝子発現系のＤＮＡ結合ドメインによって認識されるドメインを含む応答エレメントと；ｉｉ）該遺伝子発現系のトランス活性化ドメインによって活性化されるプロモーターと；およびｉｉｉ）その発現が変調されるべき遺伝子と、を含むステップと；およびｃ）宿主細胞内へリガンドを導入するステップであって；このとき該リガンドが宿主細胞内へ導入されると、該遺伝子の発現が変調されるステップと、を含む方法を提供する。

【０２１０】

本出願人らの方法を使用して宿主細胞内で発現するための当該遺伝子は、内因性遺伝子または非相同遺伝子であってよい。所望の遺伝子もしくはタンパク質についての核酸もしくはアミノ酸配列情報は、例えばＧＥＮＢＡＮＫ、ＥＭＢＬ、Ｓｗｉｓｓ　Ｐｒｏｔ、およびＰＩＲのような多数のパブリックアクセスデータベースの１つ、または多数の生物学関連雑誌出版物で検索することができる。そこで、当業者は実質的にすべての知られている遺伝子についての核酸配列情報を入手できる。その後このような情報を使用すると、ここに記載した方法で使用される遺伝子発現カセット内に当該遺伝子を挿入するための所望の構築物を構築することができる。

【０２１１】

これらの方法を使用して宿主細胞内で発現するための当該遺伝子の例には、以下のものが含まれるがそれらに限定されない：ワクチンとして植物内で生成した抗原、α－アミラーゼ、フィターゼ、グルカン、キシラーゼおよびキシラナーゼのような酵素、昆虫、線虫、真菌、細菌、ウイルス、および非生物ストレス、栄養補助食品、医薬品、ビタミンに対する耐性についての遺伝子、アミノ酸含量、除草剤耐性、耐寒性、耐乾燥性および耐熱性、工業製品、石油、タンパク質、炭水化物、抗酸化剤、雄性不稔性の植物、花、燃料、その他の産出物形質を修飾する遺伝子、例えばモノクローナル抗体、酵素、プロテアーゼ、サイトカイン、インターフェロン、インスリン、エリスロポイエチン、凝固因子、その他の血液因子もしくは成分、遺伝子療法用のウイルスベクター、ワクチン用ウイルス、創薬のターゲト、機能的ゲノミクス、ならびにプロテオミクス解析および適用等のようなある状態、疾患、障害、機能不全、遺伝的欠陥を治療するために使用できる治療的に望ましいポ

リペプチドもしくは産物をコードする遺伝子。

【０２１２】

用語「リガンド」は、ここでは「リガンド結合ドメイン」として記載されるドメインに結合する分子に関することが意図されている。同様に、コナジラミエクジソン受容体に対するリガンドは、それにエクジソン受容体が結合する天然リガンド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストとして機能できる可能性がある機能的アナログのどちらかとして機能するリガンドである。

【０２１３】

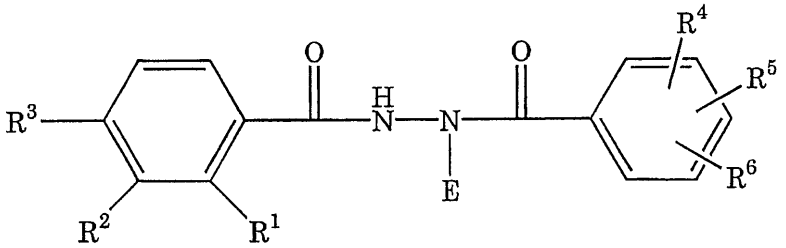
容認できるリガンドは、該リガンドの存在下で本発明による遺伝子発現系のＤＮＡ結合ドメインの応答エレメントへの結合が該遺伝子の発現の活性化または抑制を生じさせる場合に該遺伝子の発現を変調するあらゆるリガンドである。好ましいリガンドには、その各々が参照してここに組み込まれるエクジソン、２０－ヒドロキシエクジソン、ポナステロンＡ、ムリステロンＡ等のようなエクジステロイド、９－シス－レチノイン酸、レチノイン酸の合成アナログ、米国特許第６，０１３，８３６号；第５，１１７，０５７号；第５，５３０，０２８号；および第５，３７８，７２６号に開示されているようなＮ，Ｎ’－ジアシルヒドラジン；欧州特許出願第４６１，８０９号に開示されているようなジベンゾイルアルキルシアノヒドラジン；米国特許第５，２２５，４４３号に開示されているようなＮ－アルキル－Ｎ，Ｎ’－ジアロイルヒドラジン；欧州特許出願第２３４，９９４号に開示されているようなＮ－アシル－Ｎ－アルキルカルボニルヒドラジン；米国特許第４，９８５，４６１号に開示されているようなＮ－アロイル－Ｎ－アルキル－Ｎ’－アロイルヒドラジン；および３，５－ジ－ｔｅｒｔ－ブチル－４－ヒドロキシ－Ｎ－イソブチル－ベンズアミド、８－Ｏ－アセチルハルパガイド等を含むその他の類似材料が含まれる。

【０２１４】

好ましい実施形態では、遺伝子の発現を変調する方法で使用するためのリガンドは式：

【０２１５】

【化２】



【０２１６】

（式中：

Ｅは、第３級炭素を含有する（Ｃ$_4$－Ｃ$_6$）アルキルまたは第３級炭素を含有するシアノ（Ｃ$_3$－Ｃ$_5$）アルキルである。

Ｒ^{1}は、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、ｉ－Ｐｒ、Ｆ、ホルミル、ＣＦ$_3$、ＣＨＦ$_2$、ＣＨＣｌ$_2$、ＣＨ$_2$Ｆ、ＣＨ$_2$Ｃｌ、ＣＨ$_2$ＯＨ、ＣＨ$_2$ＯＭｅ、ＣＨ$_2$ＣＮ、ＣＮ、ＣＯＣＨ、１－プロピニル、２－プロピニル、ビニル、ＯＨ、ＯＭｅ、ＯＥｔ、シクロプロピル、ＣＦ$_2$ＣＦ$_3$、ＣＨ＝ＣＨＣＮ、アリル、アジド、ＳＣＮもしくはＳＣＨＦ$_2$である；

Ｒ^{2}は、Ｈ、Ｍｅ、Ｅｔ、ｎ－Ｐｒ、ｉ－Ｐｒ、ホルミル、ＣＦ$_3$、ＣＨＦ$_2$、ＣＨＣｌ$_2$、ＣＨ$_2$Ｆ、ＣＨ$_2$Ｃｌ、ＣＨ$_2$ＯＨ、ＣＨ$_2$ＯＭｅ、ＣＨ$_2$ＣＮ、ＣＮ、ＣＯＣＨ、１－プロピニル、２－プロピニル、ビニル、Ａｃ、Ｆ、Ｃｌ、ＯＨ、ＯＭｅ、ＯＥｔ、Ｏ－ｎ－Ｐｒ、ＯＡｃ、ＮＭｅ$_2$、ＮＥｔ$_2$、ＳＭｅ、ＳＥｔ、ＳＯＣＦ$_3$、ＯＣＦ$_2$ＣＦ$_2$Ｈ、ＣＯＥｔ、シクロプロピル、ＣＦ$_2$ＣＦ$_3$、ＣＨ＝ＣＨＣＮ、アリル、アジド、ＯＣＦ$_3$、ＯＣＨＦ$_2$、Ｏ－ｉ－Ｐｒ、ＳＣＮ、ＳＣＨＦ$_2$、ＳＯＭｅ、ＮＨ－ＣＮである

か、またはR^3と、並びにR^2およびR^3が結合しているフェニル炭素と一緒になって、エチレンジオキシ、フェニル炭素に隣接する酸素と一緒にジヒドロフリル環、もしくはフェニル炭素に隣接する酸素と一緒にジヒドロピリル環を形成する；
R^3は、Ｈ、Ｅｔであるか、またはR^2と、並びにR^2およびR^3が結合しているフェニル炭素と一緒になって、エチレンジオキシ、フェニル炭素に隣接している酸素と一緒にジヒドロフリル環、またはフェニル炭素に隣接している酸素と一緒にジヒドロピリル環を形成する；
R^4、R^5、およびR^6は、独立してＨ、Ｍｅ、Ｅｔ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、ホルミル、CF_3、CHF_2、$CHCl_2$、CH_2F、CH_2Cl、CH_2OH、ＣＮ、ＣＯＣＨ、１－プロピニル、２－プロピニル、ビニル、ＯＭｅ、ＯＥｔ、ＳＭｅもしくはＳＥｔである）の化合物である。

【０２１７】
また別の好ましい実施形態では、遺伝子の発現を変調する方法で使用するためのリガンドはエクジソン、２０－ヒドロキシエクジソン、ポナステロンＡ、もしくはムリステロンＡである。

【０２１８】
また別の好ましい実施形態では、遺伝子の発現を変調する方法において上記で考察した第１リガンドに加えて第２リガンドを使用できる。好ましくは、この第２リガンドは９－シス－レチノイン酸またはレチノイン酸の合成アナログである。

【０２１９】
スクリーニングアッセイ
本発明のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの同定および単離は、自然源から単離できるより多い量で、または細胞のトランスフェクションもしくは形質転換後に発現したコナジラミエクジソン受容体の活性を示すように特別に操作されている指標細胞内でコナジラミエクジソン受容体の発現を提供する。したがって、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドの構造に基づいたアゴニストおよびアンタゴニストの合理的設計に加えて、本発明は当技術分野において知られている様々なスクリーニングアッセイを使用してコナジラミエクジソン受容体の特異的リガンドを同定するための代替方法を予想している。

【０２２０】
そこで、本発明はさらにまたコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドを候補分子と接触させ、そして該リガンドの存在下でレポーター遺伝子活性を検出することによる、細胞内のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドのトランス活性化を誘導もしくは抑制する化合物のスクリーニング方法に関する。候補化合物は、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドのアゴニストもしくはアンタゴニストのいずれであってもよい。好ましい実施形態では、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドは細胞内のポリヌクレオチドから発現させられ、トランス活性化活性（すなわち、レポーター遺伝子の発現もしくは抑制）または化合物結合活性が測定される。

【０２２１】
特定実施形態では、本発明はコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドを候補分子と接触させ、そして該分子の存在下でコナジラミエクジソン受容体活性を検出することによる、細胞内のコナジラミエクジソン受容体活性を刺激もしくは阻害する分子についてのスクリーニング方法に関する。候補分子は、コナジラミエクジソン受容体のアゴニストもしくはアンタゴニストのいずれであってもよい。好ましい実施形態では、コナジラミエクジソン受容体は細胞内のポリヌクレオチドから発現させられ、該コナジラミエクジソン受容体活性はレポーター遺伝子の発現もしくはトランス活性化の誘導によって測定される。レポーター遺伝子発現の誘導はここに記載したように測定できる。

【０２２２】
そこで、本発明の１つの態様は、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドの活性を変調する分子もしくはリガンドを選択する方法である。特定実施形態では、本発明はコナジラ

ミエクジソン受容体のリガンド結合ドメインへの結合に対して特異的なリガンドを同定する方法であって
（ａ）（ｉ）コナジラミエクジソン受容体リガンド結合ドメイン、およびステロイドホルモン核受容体スーパーファミリーからのＤＮＡ結合ドメインを含むハイブリッドポリペプチドと；および（ｉｉ）第２ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとを組合わせるステップであって、このとき該ポリヌクレオチドは該ハイブリッドポリペプチドのＤＮＡ結合ドメインに応答性である転写制御エレメントへ機能的に連結している前記ステップと；
（ｂ）（ａ）のハイブリッドポリペプチドおよびポリヌクレオチドを１つの化合物へ曝露させるステップと；
（ｃ）第２ポリペプチドの発現の誘導を決定することによって（ｂ）の化合物のリガンド活性を決定するステップと；および
（ｄ）第２ポリペプチドの発現の誘導を生じさせる化合物を同定するステップと、を含む方法を提供する。

【０２２３】

本発明はさらにまた、これによりその全体が参照して組み込まれる係属出願中の米国特許出願第６０／２３７，４４６号のような直交（ｏｒｔｈｏｇｏｎａｌ）リガンドおよび直交受容体に基づく遺伝子発現系について検索するためにも有用である。

【０２２４】

エクジソン受容体のリガンド結合ドメイン（「ＬＢＤ」）は、ステロイドおよび非ステロイドアゴニストリガンドへ特異的に結合し、それによって該リガンド結合ドメインへの高親和性を備える結合特性を有する新規分子についてスクリーニングするための手段を提供する。そこで、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドのリガンド結合ドメインは結合アッセイを開発するための試薬として使用できる。１つのレベルでは、ＬＢＤは、それが結合するリガンドを選択的に保持するために、バッチもしくはカラム選択方法のための親和性試薬として使用できる。あるいはまた、リガンド結合への大きな感受性があるために機能的アッセイが好ましい。結合のための直接アッセイを通して、または発現、もしくは発現と他の機能とのその他の機能的連結を通してのどちらかで結合のためのレポーター分子を使用することによって、結合についてのアッセイを開発できる。例えば、容易にアッセイできるレポーター遺伝子とエクジソン受容体による結合に応答性の制御エレメントへの機能的連結によって、そしてリガンド結合がタンパク質誘導と機能的に連結している場合は、リガンドもしくは受容体の存在についての極めて高感受性アッセイが生じる。このような構築物は下記で説明するように２０－ヒドロキシエクジソンの存在をアッセイするために有用である。この構築物は、同翅目エクジソン受容体、特にコナジラミエクジソン受容体のアゴニストもしくはアンタゴニストについてスクリーニングするために有用である。

【０２２５】

ここに提示したように、コナジラミエクジソン受容体はエクジソン受容体に基づく遺伝子発現変調系の遺伝子発現をトランス活性化することができる。このため、遺伝子発現をトランス活性化する能力を増強するコナジラミエクジソン受容体のアゴニストは、エクジソン受容体に基づく遺伝子発現変調系における活性を向上させると期待される。コナジラミエクジソン受容体活性の阻害剤（アンタゴニスト）は、エクジソン受容体に基づく遺伝子発現変調系をトランス活性化する能力を減少させるために有用である。

【０２２６】

コナジラミエクジソン受容体アゴニストもしくはアンタゴニストについてスクリーニングするためは、当技術分野において知られているいずれかのスクリーニング技術を使用できる。例えば、コナジラミエクジソン受容体およびエクジソン受容体に基づく遺伝子発現変調系の両方を発現する適切な細胞系は、例えばβ－ガラクトシダーゼのようなマーカー遺伝子をコードする核酸を用いてトランスフェクトすることができる。細胞はその後、アゴニストもしくはアンタゴニストを含む試験溶液に曝露させられ、そしてβ－ガラクトシダ

ーゼ活性について染色される。試験溶液に曝露していない対照細胞と比較してより多数のβ－ｇａｌ陽性細胞の存在は、試験溶液中にコナジラミエクジソン受容体アゴニストが存在する指標である。これとは逆に、試験溶液に曝露していない対照細胞と比較してより少数のβ－ｇａｌ陽性細胞の存在は、試験溶液中にコナジラミエクジソン受容体アンタゴニストが存在する指標である。

【０２２７】

本発明は、小分子リガンドもしくはリガンドアナログおよび模擬体についてのスクリーニング、ならびにインビボでコナジラミエクジソン受容体に結合して作動化もしくは拮抗する天然リガンドについてのスクリーニングを予想している。例えば、天然産物ライブラリーは、本発明のアッセイを使用してコナジラミエクジソン受容体活性を作動化もしくは拮抗する分子についてスクリーニングすることができる。

【０２２８】

コナジラミエクジソン受容体の１次配列、およびその配列と機能が分かっているタンパク質との類似性についての知識は、該タンパク質の阻害剤もしくはアンタゴニストとしての最初の手掛かりを提供できる。アンタゴニストの同定およびスクリーニングはさらに、例えばＸ線結晶学、中性子回折、核磁気共鳴分光法、および構造決定のためのその他の方法を使用して該タンパク質の構造的特徴を決定することによって容易になる。これらの方法は、アゴニストおよびアンタゴニストの合理的設計または同定を提供する。

【０２２９】

また別のアプローチは、大規模ライブラリーを作製するために組み換えバクテリオファージを使用する。「ファージ法」［Ｓｃｏｔｔ ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ，１９９０，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０（１９９０）；Ｃｗｉｒｌａら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，８７：６３７８－６３８２（１９９０）；Ｄｅｖｌｉｎら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９：４０４－４０６（１９９０）］を使用すると、極めて大規模なライブラリーを構築できる（10^{6}－10^{8}の化学実体）。第２のアプローチは主として化学的方法を使用するが、その例はＧｅｙｓｅｎ法［Ｇｅｙｓｅｎら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２３：７０９－７１５（１９８６）；Ｇｅｙｓｅｎら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃ Ｍｅｔｈｏｄ １０２：２５９－２７４（１９８７）］およびＦｏｄｏｒら［Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：７６７－７７３（１９９１）］である。Ｆｕｒｋａら［１４ｔｈ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｎｇｒｅｓｓ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｖｏｌｕｍｅ ５，Ａｂｓｔｒａｃｔ ＦＲ：０１３（１９８８）；Ｆｕｒｋａ，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｓ．３７：４８７－４９３（１９９１）］、Ｈｏｕｇｈｔｏｎ［１９８６年１２月に発行された米国特許第４，６３１，２１１号］およびＲｕｔｔｅｒら［１９９１年４月２３日に発行された米国特許第５，０１０，１７５号］は、アゴニストもしくはアンタゴニストとして試験できるペプチド混合物を作製する方法を記載している。

【０２３０】

また別の態様では、合成ライブラリー［その全体が参照してここに組み込まれるＮｅｅｄｅｌｓら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：１０７００－４（１９９３）；Ｏｈｌｍｅｙｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：１０９２２－１０９２６（１９９３）；Ｌａｍら，国際特許出願第ＷＯ９２／００２５２号；Ｋｏｃｉｓら，国際特許出願第ＷＯ９４２８０２８号］等を使用すると、本発明によるコナジラミエクジソン受容体リガンドについてスクリーニングすることができる。

【０２３１】

スクリーニングは、コナジラミエクジソン受容体を発現する組み換え細胞を用いて、あるいはまた例えば上述のように組み換え作製された精製タンパク質を使用して実施できる。例えば、標識した可溶性コナジラミエクジソン受容体を使用すると、上記の参考文献に記載されたようなライブラリーをスクリーニングすることができる。

【０２３２】

１つの実施形態では、コナジラミエクジソン受容体は直接に標識することができる。また別の実施形態では、標識した第２試薬を使用するとコナジラミエクジソン受容体の例えば固相支持体に付着した分子のような当該分子への結合を検出することができる。結合は、酵素標識による発色団のインサイチュー形成によって検出できる。適切な酵素には、アルカリホスファターゼおよびホースラディッシュペルオキシダーゼが含まれるがそれらに限定されない。また別の実施形態では、相違する当該アクセプター分子上に２種の酵素標識を備える２つの色素産生基質を使用する２色アッセイを使用できる。２色アッセイを使用すると、交差反応性および単独反応性リガンドを同定できる。

【０２３３】

本発明で使用するための他の標識には、着色ラテックスビーズ、磁性ビーズ、蛍光標識（例えば、小数の蛍光体を挙げると、蛍光イソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、フィコエリトリン（ＰＥ）、テキサスレッド（ＴＲ）、ローダミン、遊離もしくはキレート化ランタン系列塩、詳細にはEu^{3+}）、化学ルミネセンス分子、放射性同位体、または磁気共鳴イメージング標識が含まれる。２色アッセイは、２つ以上の着色ラテックスビーズ、または相違する波長で発光する蛍光体を用いて実施できる。標識は、視覚的に、または機械的／光学的手段によって検出できる。機械的／光学的手段には、すなわちＦＡＣＳに類似する蛍光活性化ソーティング、およびマイクロマニピュレーター除去手段が含まれる。

【０２３４】

ここに例示したように、コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドの濃度はタンパク質の代謝標識によって評価できる。代謝標識化は［^{35}Ｓ］－メチオニンを補給した培地の存在下で組織生検のインビトロ培養中に発生するので、検出されたマーカーの各々のレベルはインビトロ条件によって影響を受けることがある。［^{35}Ｓ］－メチオニンを用いた代謝（もしくは生合成）標識に加えて、本発明はさらに［^{14}Ｃ］－アミノ酸および［^{3}Ｈ］－アミノ酸（安定性位置で置換されたトリチウムを備える）を用いた標識を予想している。そこで、化合物のサンプルもしくはライブラリーは、例えば小数の方法を挙げると銀、金、クマジーブルー、もしくはアミドシュワルツを使用した比色染色；例えば「^{32}Ｐ」－オルトリン酸、［^{125}Ｉ］、［^{131}Ｉ］を用いた同位体標識；蛍光もしくは化学ルミネセンスタグ；およびマーカーの標識抗体もしくは特異的結合パートナーを用いての免疫学的検出によって、タンパク質の標識後に直接分析できる。

【０２３５】

昆虫の生理または発達を変調する

コナジラミエクジソン受容体の単離は、受容体結合についての新規リガンドの単離またはスクリーニングを提供する。これらの一部は、正常な昆虫発達を妨害または中断するであろう。ときには、例えば放出するための無菌成体を作製する際に、昆虫発達を加速または減速するのが重要なことがある。あるいはまた、一定の状況では、発達の時期の遅延または変化は致死性なことがある、または農作物に影響を及ぼす昆虫の能力を劇的に修飾することがある。そこで、昆虫発達の時期を中断させる天然型の生物分解性かつ高度に活性の分子が生じるであろう。

【０２３６】

本発明は、新規リガンドアゴニストもしくはアンタゴニストが発見されている昆虫発達を中断させる手段を提供する。これらの化合物は、正常昆虫発達を妨害するためのアゴニストもしくはアンタゴニストとしての主要な候補である。コナジラミエクジソン受容体に対するリガンドの新規アナログを適用することによって、発達事象の正常時間順序を修飾することが可能である。例えば、昆虫発達の加速は世代時間を最小限に抑えるであろう。これは、最終的に例えば不妊雄性を生成する際に極めて多数の昆虫が望ましい状況においては極めて重要なことがある。あるいはまた、商品作物が感受性段階を通過した後に昆虫が発達の破壊性段階に到達するように、害虫侵入における発達を緩徐化することが有用なことがある。別の商業的適用では、本発明によって提供された方法により発見されたリガンドを使用して、昆虫を人工的に特定発達段階で保持することができる。幼虫の発達は、さらに自然より速い生活環で特定発達段階に到達するように加速することもできる。

【０２３７】
適用すると正常発達を完全に破壊して致死性結果および害虫駆除を生じさせることのできる、コナジラミエクジソン受容体に対するリガンドの他のアナログを選択できる。実際に、種特異的である、または特別に有用な有効性スペクトルを示すコナジラミエクジソン受容体に対する新規リガンドがある可能性がある。リガンドの特異性が大きいほど、望ましくない有害な環境的副作用を有する非特異的殺虫剤の使用を回避できるであろう。さらに、天然化合物に密接に類似する構造を有する化合物は、生物学的分解の自然機序を受け易い可能性がある。

【０２３８】
そこで、本発明はさらに昆虫の生理もしくは発達を変調（例、殺滅）するリガンド結合ドメインへの特異的結合を示す化合物を同定かつ選択する方法であって、同翅目エクジソン受容体への結合について化合物をスクリーニングするステップと、前記結合を示す化合物を選択するステップと、および同翅目昆虫へ該リガンドを投与するステップと、を含む方法を提供する。特定実施形態では、昆虫の生理もしくは発達を変調する方法は、コナジラミエクジソン受容体への結合について化合物をスクリーニングするステップと、前記結合を示す化合物を選択するステップと、および該リガンドをコナジラミへ投与するステップと、を含む。

【０２３９】
ポリペプチド生成

本発明の精製コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドは、さらに精製コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドの構造的および生合成的特徴を決定する方法において有用である。リガンド結合ドメインと選択したリガンドとの相互作用についての構造試験は、様々な方法によって実施できる。構造決定のための好ましい方法は、Ｘ線結晶学であるが、様々な他の形の分光法またはクロマトグラフィーを含むことができる。例えば、参照してここに組み込まれるＣｏｎｎｏｌｌｙ，Ｍ．Ｌ．，Ｊ．Ａｐｐｌ．Ｃｒｙｓｔａｌｌ．１６：５４８（１９８３）；およびＣｏｎｎｏｌｌｙ，Ｍ．Ｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ２２１：７０９（１９８３）を参照。例えば、リガンドとリガンド結合ドメインとの相互作用の構造は、高分解能で決定できる。

【０２４０】
実質的純粋ポリペプチド、その生物学的活性フラグメントおよびそれらをコードする組み換えポリヌクレオチドを提供したが、本発明はさらにまたそれらの各々を含む細胞も提供する。当技術分野においてよく知られている適切な導入方法によって、それらを含む細胞を作製できる。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）を参照。

【０２４１】
宿主細胞および非ヒト生物

本発明のまた別の態様には、本発明のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを含む細胞が含まれる。特定実施形態では、本発明は本発明のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む単離宿主細胞に関する。本発明は、さらにまた本発明による発現ベクターを含む単離宿主細胞に関する。また別の特定実施形態では、本発明は本発明のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子発現カセットを含む単離宿主細胞に関する。また別の特定実施形態では、本発明は本発明のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子発現変調系を用いてトランスフェクトされた単離宿主細胞に関する。また別の特定実施形態では、本発明はさらに本発明によるコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドを含むエクジソン受容体に基づく遺伝子発現系を含む単離宿主細胞を提供する。また別の特定実施形態では、本発明は本発明のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドを含む単離宿主細胞に関する。さらにまた別の実施形態では、本発明はコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドを生成する方法に関するが、このとき該方法は本発明のコナジラミエクジソン受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離宿主細胞を、培地中での該コナジラミエクジソン受容

体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を許容する条件下で培養するステップと、および該培地から該コナジラミエクジソン受容体ポリペプチドを単離するステップと、を含む。

【０２４２】

上記に記載したように、本発明のポリペプチドおよびそれらをコードするポリヌクレオチドを使用すると、宿主細胞内の遺伝子発現を変調させることができる。トランスジェニック宿主細胞内の発現は、様々な当該遺伝子を発現させるために有用なことがある。本出願人らの発明は、原核および真核宿主細胞内での遺伝子発現の変調を提供する。トランスジェニック宿主細胞内での発現は、ワクチンとして植物内で生成した抗原、α－アミラーゼ、フィターゼ、グルカナーゼ、キシラーゼおよびキシラナーゼのような酵素、昆虫、線虫、真菌、細菌、ウイルス、および非生物ストレス、抗原、栄養補助食品、医薬品、ビタミンに対する耐性についての遺伝子、アミノ酸含量、除草剤耐性、耐寒性、耐乾燥性および耐熱性、工業製品、石油、タンパク質、炭水化物、抗酸化剤、雄性不稔性の植物、花、燃料、その他の産出物形質、治療用ポリペプチド、経路中間体を修飾する遺伝子；該宿主を使用してこれまでは不可能であった新規産物を合成するための該宿主内にすでに存在する経路を変調するため；細胞に基づくアッセイ；機能的ゲノミクス、生物療法的タンパク質生成、プロテオミクスアッセイ等を含むがそれらに限定されない様々な当該ポリペプチドの発現のために有用である。さらに、遺伝子産物は、宿主のより高度の増殖収率を付与するため、または代替成長様式を利用することを可能にするために有用なことがある。

【０２４３】

特定実施形態では、単離宿主細胞は原核宿主細胞または真核宿主細胞である。また別の特定実施形態では、単離宿主細胞は無脊椎動物宿主細胞または脊椎動物宿主細胞である。好ましくは、単離宿主細胞は細菌細胞、真菌細胞、酵母細胞、線虫細胞、昆虫細胞、魚細胞、植物細胞、鳥細胞、動物細胞、および哺乳動物細胞からなる群から選択される。より好ましくは、単離宿主細胞は酵母細胞、線虫細胞、昆虫細胞、植物細胞、ゼブラフィッシュ細胞、ニワトリ細胞、ハムスター細胞、マウス細胞、ラット細胞、ウサギ細胞、ネコ細胞、イヌ細胞、ウシ細胞、ヤギ細胞、雌牛細胞、ブタ細胞、ウマ細胞、ヒツジ細胞、類人猿細胞、サル細胞、チンパンジー細胞、またはヒト細胞である。

【０２４４】

好ましい宿主細胞の例にはアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、トリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）、サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、ピチア（Ｐｉｃｈｉａ）、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）、ハンゼヌラ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）のような真菌もしくは酵母種、またはシネコシストシス（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｙｓｔｉｓ）、シネココッカス（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、バシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、アシネトバクター（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）、ロードコッカス（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ）、ストレプトマイセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）、エシェリキア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）、メチロモナス（Ｍｅｔｈｙｌｏｍｏｎａｓ）、メチロバクター（Ｍｅｔｈｙｌｏｂａｃｔｅｒ）、アルカリゲネス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）、シネコシストシス（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｙｓｔｉｓ）、アナベナ（Ａｎａｂａｅｎａ）、チオバシラス（Ｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、メタノバクテリウム（Ｍｅｔｈａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）およびクレブシエラ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）属のような細菌種；リンゴ、シロイヌナズナ、トウジンビエ、バナナ、オオムギ、マメ、テンサイ、ブラックグラム、ヒヨコマメ、トウガラシ、キュウリ、ナス、ソラマメ、トウモロコシ、メロン、アワ、緑豆、オートムギ、オクラ、キビ、パパイヤ、ピーナッツ、エンドウマメ、コショウ、キマメ、パイナップル、インゲンマメ、ジャガイモ、カボチャ、イネ、モロコシ、ダイズ、スカッシュ、サトウキビ、サトウダイコン、ヒマワリ、サツマイモ、茶、トマト、タバコ、スイカおよびコムギからなる群から選択される植物種；動物；および哺乳動物の宿主細胞が含まれるがそれらに限定されない。

【０２４５】

特定実施形態では、単離宿主細胞はサッカロミセス、ピチア、およびカンジダ宿主細胞からなる群から選択された酵母細胞である。

【０２４６】

また別の特定実施形態では、単離宿主細胞はＣａｅｎｏｒｈａｂｄｕｓ　ｅｌｅｇａｎｓ線虫細胞である。

【０２４７】

また別の特定実施形態では、単離宿主細胞はリンゴ、シロイヌナズナ、トウジンビエ、バナナ、オオムギ、マメ、テンサイ、ブラックグラム、ヒヨコマメ、トウガラシ、キュウリ、ナス、ソラマメ、トウモロコシ、メロン、アワ、緑豆、オートムギ、オクラ、キビ、パパイヤ、ピーナッツ、エンドウマメ、コショウ、キマメ、パイナップル、インゲンマメ、ジャガイモ、カボチャ、イネ、モロコシ、ダイズ、スカッシュ、サトウキビ、サトウダイコン、ヒマワリ、サツマイモ、茶、トマト、タバコ、スイカおよびコムギからなる群から選択される植物細胞である。

【０２４８】

また別の特定実施形態では、単離宿主細胞はゼブラフィッシュ細胞である。

【０２４９】

また別の特定実施形態では、単離宿主細胞はニワトリ細胞である。

【０２５０】

また別の特定実施形態では、単離宿主細胞は、ハムスター細胞、マウス細胞、ラット細胞、ウサギ細胞、ネコ細胞、イヌ細胞、ウシ細胞、ヤギ細胞、雌牛細胞、ブタ細胞、ウマ細胞、ヒツジ細胞、サル細胞、チンパンジー細胞、またはヒト細胞からなる群から選択された哺乳動物細胞である。

【０２５１】

宿主細胞形質転換は当技術分野においてよく知られており、電気泳動、ウイルス感染、プラスミド／ベクタートランスフェクション、非ウイルスベクター媒介性トランスフェクション、アグロバクテリウム媒介性形質転換、粒子衝撃等を含むがそれらに限定されない様々な方法によって達成できる。所望の遺伝子産物の発現には、適切な条件下で形質転換宿主細胞を培養するステップと、および形質転換遺伝子の発現を誘導するステップと、が含まれる。原核および真核細胞内での培養条件および遺伝子発現プロトコールは、当技術分野においてよく知られている（実施例の一般的方法のセクションを参照）。細胞を採取し、遺伝子産物は該遺伝子産物に特定のプロトコールによって単離できる。

【０２５２】

さらに、トランスフェクトされたポリヌクレオチドの発現を変調する、または所望の特定様式でポリペプチド産物を修飾およびプロセシングする宿主細胞を選択することができる。様々な宿主細胞は、タンパク質の翻訳および翻訳後プロセシングならびに修飾［例、グリコシル化、開裂（例、シグナル配列の）］のための特徴的および特異的機構を有している。発現した外来タンパク質の所望の修飾およびプロセシングを保証するために、適切な細胞系または宿主系を選択することができる。例えば、細菌系中での発現を使用すると非グリコシル化コアタンパク質産物を作製することができる。しかし、細菌中で発現したポリペプチドは適正に折りたたまれないことがある。酵母内での発現は、グリコシル化産物を生成することができる。真核細胞内での発現は、非相同タンパク質の「天然」グリコシル化および折りたたみの可能性を増加させることができる。さらに、哺乳動物細胞内での発現は、ポリペプチドの活性を再構成するため、または構成するためのツールを提供できる。さらに、様々なベクター／宿主発現系は、様々な程度にタンパク質分解開裂のようなプロセシング反応に影響を及ぼすことができる。

【０２５３】

本出願人らの発明は、さらにまた本発明による単離宿主細胞を含む非ヒト生物に関する。特定実施形態では、非ヒト生物は原核生物または真核生物である。また別の特定実施形態では、非ヒト生物は無脊椎生物または脊椎生物である。

【０２５４】

好ましくは、非ヒト生物は細菌、真菌、酵母、線虫、昆虫、魚、植物、鳥、動物、および哺乳動物からなる群から選択される。より好ましくは、非ヒト生物は酵母、線虫、昆虫、植物、ゼブラフィッシュ、ニワトリ、ハムスター、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヤギ、雌牛、ブタ、ウマ、ヒツジ、類人猿、サル、またはチンパンジーである。

【０２５５】

特定実施形態では、非ヒト生物はサッカロミセス、ピチア、およびカンジダからなる群から選択された酵母である。

【０２５６】

また別の特定実施形態では、非ヒト生物はＣａｅｎｏｒｈａｂｄｕｓ　ｅｌｅｇａｎｓ線虫である。

【０２５７】

また別の特定実施形態では、非ヒト生物は、リンゴ、シロイヌナズナ、トウジンビエ、バナナ、オオムギ、マメ、テンサイ、ブラックグラム、ヒヨコマメ、トウガラシ、キュウリ、ナス、ソラマメ、トウモロコシ、メロン、アワ、緑豆、オートムギ、オクラ、キビ、パパイヤ、ピーナッツ、エンドウマメ、コショウ、キマメ、パイナップル、インゲンマメ、ジャガイモ、カボチャ、イネ、モロコシ、ダイズ、スカッシュ、サトウキビ、サトウダイコン、ヒマワリ、サツマイモ、茶、トマト、タバコ、スイカおよびコムギからなる群から選択される植物である。

【０２５８】

また別の特定実施形態では、非ヒト生物はＭｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓマウスである。

【０２５９】

遺伝子発現／転写の測定

本発明の新規ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、および／または遺伝子カセットを使用して遺伝子発現を変調する方法の１つの有用な測定は、ＲＮＡ、好ましくはｍＲＮＡ種の同一度および存在度を含む細胞の転写状態の測定である。このような測定は、便利にも数種の現行遺伝子発現テクノロジーのいずれかによってｃＤＮＡ存在度を測定することによって実施される。

【０２６０】

核酸アレイテクノロジーは、示差的ｍＲＮＡ発現を決定するための有用な技術である。このようなテクノロジーには、例えばオリゴヌクレオチドチップおよびＤＮＡマイクロアレイが含まれる。これらの技術は、固相支持体上に固定化され、細胞、組織、もしくは生物全体から抽出された全ｍＲＮＡプールから調製されたプローブへハイブリダイズされてｃＤＮＡへ転化される様々な遺伝子もしくはｃＤＮＡに一致するＤＮＡフラグメントまたはオリゴヌクレオチドに依存している。オリゴヌクレオチドチップは光リソグラフィー法を使用して基体上で合成されたオリゴヌクレオチドのアレイである。１７００個までの遺伝子を解析できるチップが製造されている。ＤＮＡマイクロアレイは、顕微鏡スライド上にロボットにより印刷されるＤＮＡサンプル、典型的にはＰＣＲ産物のアレイである。各遺伝子は、全長、または部分長の標的ＤＮＡ配列によって解析される。１０，０００個までの遺伝子を備えるマイクロアレイは、現在日常的に商業生産されている。これら２種の技術の主要な相違は、オリゴヌクレオチドチップは典型的には短いＤＮＡ分子の分別を許容する２５－ｍｅｒオリゴヌクレオチドを利用するが、他方約１０００塩基対のマイクロアレイのより大きなＤＮＡ標的は、複雑なＤＮＡ混合物を分別する際により高度の感受性を提供できることにある。

【０２６１】

本発明の出願人らの方法のまた別の有用な測定は、当技術分野においてよく知られている方法を使用して細胞内に存在する構成タンパク質種の存在度を測定することにより細胞の翻訳状態を決定する測定である。

【０２６２】

様々な生理学的機能に関連する遺伝子の同定が所望である場合は、細胞増殖、アポトーシス、老化、分化、接着、特定分子への結合、別の細胞への結合、細胞組織化、器官発生、

細胞内輸送、輸送促進、エネルギー転換、代謝、筋形成、神経形成、および／または造血のような機能における変化が測定されるアッセイを使用できる。

【０２６３】

さらに、選択可能なマーカーもしくはレポーター遺伝子発現を使用すると本出願人らの発明を使用した遺伝子発現変調を測定できる。

【０２６４】

遺伝子発現の産物を検出するためのその他の方法は当技術分野においてよく知られており、サザンブロット（ＤＮＡ検出）、ドットもしくはスロットブロット（ＤＮＡ、ＲＮＡ）、ノーザンブロット（ＲＮＡ）、ＲＴ－ＰＣＲ（ＲＮＡ）、ウェスタンブロット（ポリペプチド検出）、およびＥＬＩＳＡ（ポリペプチド）解析が含まれる。好ましさは小さいが、標識タンパク質を使用するとそれにハイブリダイズする特定核酸配列を検出することができる。

【０２６５】

一部の場合には、核酸配列の量を増幅させることが必要である。これは、例えばポリメラーゼ連鎖反応（「ＰＣＲ」）、リガーゼ連鎖反応（「ＬＣＲ」）、ストランド置換増幅法（「ＳＤＡ」）、転写に基づく増幅法等を含む多数の適切な方法の１つ以上を使用して実行されてよい。ＰＣＲは、例えば核酸サンプルが耐熱性ＤＮＡポリメラーゼの存在下で、ハイブリダイゼーション条件下で、１つのプライマーは検出される特定配列の１本の鎖（テンプレート）へハイブリダイズする１対のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて処理される知られている技術によって実施される。これらのプライマーは、それらとハイブリダイズする特定配列の各テンプレートストランドに対して十分に相補的である。各プライマーの伸長産物が合成されるが、それはそれにハイブリダイズする核酸テンプレートストランドに対して相補的である。各プライマーから合成される伸長産物は、同一プライマーを使用した伸長産物のその後の合成のためのテンプレートとして機能することもできる。伸長産物の合成の十分なラウンド数後、サンプルは検出される１つ以上の配列が存在するかどうかを判定するために上述の通り解析することができる。

【０２６６】

本発明は、本発明の例示として提供されている以下の非限定的実施例を参照するとより明確に理解できる。

【実施例】

【０２６７】

一般的分子生物学技術

本発明によると、当技術の範囲内の従来型分子生物学、微生物学、および組み換えＤＮＡ技術を使用できる。このような技術は文献において十分に説明されている。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ　＆　Ｍａｎｉａｔｉｓ，「分子クローニング：実験マニュアル、第２版（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，　Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ）（１９８９），Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ニューヨーク（ここでは「Ｓａｍｂｒｏｏｋら，　１９８９」と記す）；「ＤＮＡクローニング：実用的アプローチ、第ＩおよびＩＩ巻（ＤＮＡ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ，　Ｖｏｌｕｍｅｓ　Ｉ　ａｎｄ　ＩＩ）（Ｄ．Ｎ．　Ｇｌｏｖｅｒ編集，１９８５）；オリゴヌクレオチド合成（Ｍ．Ｊ．　Ｇａｉｔ編集１９８４）；「核酸ハイブリダイゼーション（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ）」［Ｂ．Ｄ．　Ｈａｍｅｓ　＆　Ｓ．Ｊ．　Ｈｉｇｇｉｎｓ　ｅｄｓ．（１９８５）］；「転写および翻訳（Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ａｎｄ　Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ）」［Ｂ．Ｄ．　Ｈａｍｅｓ　＆　Ｓ．Ｊ．　Ｈｉｇｇｉｎｓ編集（１９８４）］；「動物細胞培養（Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ）」［Ｒ．Ｉ．　Ｆｒｅｓｈｎｅｙ編集（１９８６）］；「固定化細胞および酵素（Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ　Ｃｅｌｌｓ　Ａｎｄ　Ｅｎｚｙｍｅｓ）」［ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ，（１９８６）］；Ｂ．　Ｐｅｒｂａｌ，「分子クローニングの実用ガイド（Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ

Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ）」（１９８４）；Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌら（編集），「分子生物学における最新プロトコール（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）」，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．（１９９４）を参照。

【０２６８】

従来型クローニングビヒクルには、ｐＢＲ３２２およびｐＵＣタイプのプラスミドおよびＭ１３シリーズのファージが含まれる。これらは市販で入手できる（Ｂｅｔｈｅｓｄａ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ製）。

【０２６９】

ライゲーションのためには、ＤＮＡフラグメントはアガロースもしくはアクリルアミドゲル電気泳動によってそれらのサイズにしたがって分離し、フェノールもしくはフェノール／クロロホルム混合液を用いて抽出し、エタノールを用いて沈降させ、さらに供給業者の推奨にしたがってファージＴ４ ＤＮＡリガーゼ（Ｂｉｏｌａｂｓ製）の存在下でインキュベートできる。

【０２７０】

５’の突出端への充填は、供給業者の仕様書にしたがって、Ｅ．ｃｏｌｉＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウフラグメント（Ｂｉｏｌａｂｓ製）を用いて実施できる。３’突出端の破壊は、製造業者の推奨にしたがって使用されるファージＴ４ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｂｉｏｌａｂｓ製）の存在下で実施される。５’の突出端の破壊は、Ｓ１ヌクレアーゼを用いた制御された処理によって実施される。

【０２７１】

合成オリゴデオキシヌクレオチドによりインビトロで方向付けられる突然変異誘発は、Ａｍｅｒｓｈａｍ社が流通させているキットを使用してＴａｙｌｏｒら［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ． １３（１９８５）８７４９－８７６４］によって開発された方法によって実施できる。

【０２７２】

ＰＣＲによるＤＮＡフラグメントの酵素増幅技術［「ポリメラーゼ触媒連鎖反応（Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ－ｃａｔａｌｙｚｅｄ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ）」，Ｓａｉｋｉ Ｒ．Ｋ．ら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０（１９８５） １３５０－１３５４；Ｍｕｌｌｉｓ Ｋ．Ｂ． ａｎｄ Ｆａｌｏｏｎａ Ｆ．Ａ．，Ｍｅｔｈ． Ｅｎｚｙｍ． １５５（１９８７）３３５－３５０］は、製造業者の仕様書にしたがって「ＤＮＡサーマルサイクラー（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ Ｃｅｔｕｓ製）を使用して実施できる。

【０２７３】

ヌクレオチド配列の検証は、Ａｍｅｒｓｈａｍ社が流通させているキットを使用してＳａｎｇｅｒら［Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ． Ａｃａｄ． Ｓｃｉ． ＵＳＡ ７４：５４６３－５４６７（１９７７）］によって開発された方法によって実施できる。

【０２７４】

プラスミドＤＮＡは製造業者の取扱説明書にしたがってＱｉａｇｅｎ製プラスミド精製システムによって精製できる。

【０２７５】

実施例１

この実施例では、コナジラミＢａｍｅｃｉａ ａｒｇｅｎｔｉｆｏｌｉエクジソン受容体ポリペプチドをコードする全長ｃＤＮＡのクローニングについて説明する。この以前には知られていないコナジラミエクジソン受容体アイソフォーム（ここでは「ＢａＥｃＲ」と称する）の全長コード配列を単離するために、混合段階のコナジラミ若虫（第１～４齢）および蛹から入手した全ＲＮＡから調製したコナジラミｃＤＮＡライブラリーを使用した。手短には、製造業者の取扱説明書にしたがってＺａｐ Ｅｘｐｒｅｓｓ ｃＤＮＡ Ｇｉｇａｐａｃｋ ＩＩ Ｇｏｌｄ（商標）クローニングキット（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ製、ラ・ホーヤ、カリフォルニア州）を使用してｃＤＮＡライブラリーをＵＮＩ－ＺＡＰ ＸＲ（商標）ベクター内へ構築した。本出願人らは、ＲＴ－ＰＣＲを使用してコナジラミ

全ＲＮＡから４４１塩基対（ｂｐ）ｃＤＮＡフラグメント（配列番号：７）を増幅かつ入手するために、エクジソン受容体Ｃ（ＫＫＣＬＳＶＧＭ；配列番号：５）およびＥ（ＫＬＩＲＥＤＱＩ；配列番号：６）ドメインの保存領域に基づいて設計された縮退オリゴヌクレオチド（表２を参照；配列番号：３および４）を使用した。

【０２７６】

【表２】

プライマーおよび配列番号:	プライマー核酸配列
プライマー1(配列番号:3)	5'-aa(a/g)aa(a/g)tg(t/c)ct(t/c/a/g)ag(t/c)gt(t/c/a/g)gg(t/c/a/g)atg-3'
プライマー2(配列番号:4)	5'-(a/g/t)at(t/c)tg(a/g)tc(t/c)tc(t/a/c/g)cg(a/g/t)at(t/c/a/g)ag(t/c)tt-3'

【０２７７】

逆転写は、ＴＨＥＲＭＯＳＣＲＩＰＴ　ＲＴ－ＰＣＲシステム（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ製）によって実施された。ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅は、ＴａｑＰｌｕｓポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を使用して実施し、反応条件およびサイクルパラメーターは以下の通りであった。ＰＣＲは、最終反応液量を５０μｌとする１×反応バッファー（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ製）、５０ｎｇのｄｓＤＮＡテンプレート、１２５ｎｇのフォワードプライマー（プライマー１）、１２５ｎｇのリバース相補的プライマー（プライマー２）、および１μｌのｄＮＴＰミックス（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して実施した。使用したサイクルパラメーターは、９５℃、１分間での変性、５５℃、５０秒間でのアニーリング、および７２℃、５０秒間での伸長の３５サイクル、およびその後に７２℃、１０分間での最終伸長１サイクルから構成した。

【０２７８】

生じた４４１ｂｐ　ｃＤＮＡフラグメント（配列番号：７）をプローブとして使用して、全長ＢａＥｃＲ　ｃＤＮＡクローンについての、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションおよび洗浄プロトコールの後にコナジラミｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーション条件およびファージ感染法はＺａｐ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　ｃＤＮＡ　Ｇｉｇａｐａｃｋ　ＩＩ　Ｇｏｌｄ（商標）クローニングキット（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、ラ・ホーヤ、カリフォルニア州）に添付の製造業者の取扱説明書および上記のＭａｎｉａｔｉｓらの推奨にしたがって実施した。１個の陽性クローンを単離し、精製し、インビボ切除し、そして標準プロトコール（上記のＭａｎｉａｔｉｓらを参照）を使用してその対応するコナジラミｃＤＮＡインサートの両方の鎖についてシーケンシングした。

【０２７９】

全長ＢａＥｃＲをコードするこの単離ｃＤＮＡクローンのポリヌクレオチド配列は、配列番号：１として提示した。全長ＢａＥｃＲの推定アミノ酸配列はここでは配列番号：２として提示したが、これは他のＥｃＲの推定アミノ酸配列と高度の類似性を示した（データは示していない）。

【０２８０】

実施例２

この実施例では、コナジラミエクジソン受容体遺伝子発現カセットの構築およびエクジソン受容体に基づく遺伝子発現変調系におけるそれらの使用について説明する。ここに提示した結果は、コナジラミエクジソン受容体が昆虫細胞および哺乳動物細胞の両方においてエクジソン受容体に基づく遺伝子発現変調系で機能的であることを証明している。

【０２８１】

Ａ）昆虫細胞：

手短には、ＢａＥｃＲ　ＣＤＥドメイン（配列番号：２のアミノ酸５３～４１６）を次のようにＶＰ１６トランス活性化ドメイン（配列番号：８）へ融合させた。ＢａＥｃＲ－ＣＤＥポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（配列番号：１のヌクレオチド２５９～

１３４９）をNH_2末端でＶＰ１６活性化ドメインをコードするポリヌクレオチド（配列番号：９）へ融合させることによって、１つの構築物を作製した。このＶＰ１６ＢａＥｃＲ融合体は、その後バキュロウイルスＩＥ１プロモーター（配列番号：１０）の制御下にクローン化させた。ＶＰ１６ＢａＥｃＲ遺伝子発現カセットは、６Ｘ　ＥＣＲＥ応答エレメントを含むレポーター構築物ＥｃＲＥＬａＣＺ（１Ｘ　ＥｃＲＥは配列番号：１１に示した）、ＡＤＨ遠位プロモーター（Ｈｅｂｅｒｌｅｉｎら，　１９８５，　Ｃｅｌｌ　４１：９６５－９７７およびＫｏｅｌｌｅら，　１９９１，　Ｃｅｌｌ　６７：５９－７７を参照）およびＬａｃＺレポーター遺伝子（配列番号：１２）と一緒にＬ５７細胞系（内因性ＥｃＲが欠損するショウジョウバエ細胞系）およびメキシコワタノミゾウムシ（ｃｏｔｔｏｎ　ｂｏｌｌ　ｗｅｅｖｉｌ）（「ＣＢＷ」；Ａｎｔｈｏｎｏｍｕｓ　ｇｒａｎｄｉｓ）　ＢＲＬ－ＡＧ－２細胞系（寛容にもＵＳＤＡ，　ＡＲＳ，　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、ファーゴ、ノースダコタ州から提供された）内へトランスフェクトした。レポーター遺伝子活性は、０、０．０００１、０．００１、０．０１、０．１、１、１０、および１００μｍの２０－ヒドロキシエクジソン（２０Ｅ）リガンドまたはＮ－（２－エチル－３－メトキシベンゾイル）－Ｎ’－（３，５－ジメチルベンゾイル）－Ｎ’－ｔｅｒｔ－ブチルヒドラジン（ＧＳ（商標）－Ｅ）リガンドの存在下で定量した。

【０２８２】

リガンド：ステロイドリガンド２０－ヒドロキシエクジソン（２０Ｅ）はシグマ・ケミカル社から購入した。非ステロイドリガンドのＮ－（２－エチル－３－メトキシベンゾイル）－Ｎ’－（３，５－ジメチルベンゾイル）－Ｎ’－ｔｅｒｔ－ブチルヒドラジン（ＧＳ（商標）－Ｅ）は、Ｒｏｈｍ　ａｎｄ　Ｈａａｓ社で合成された合成安定性エクジステロイドリガンドである。これらのリガンドはＤＭＳＯ中に溶解させ、対照群および処理群のどちらにおいてもＤＭＳＯの最終濃度は０．１％で維持した。

【０２８３】

トランスフェクション：上述した遺伝子構築物に対応するＤＮＡを以下の通りにＬ５７またはＣＢＷ細胞内へトランスフェクトした。Ｌ５７または細胞はＨｙＱ－ＣＣＭ３培地（Ｈｙｃｌｏｎｅ　Ｌａｂｓ製）中で増殖させ、リポフェクトミン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ製）を用いてトランスフェクトした。ＣＢＷ細胞は、Ｅｘ－Ｃｅｌｌ　４０１（ＪＲＨ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ製）中で増殖させ、セルフェクチン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）を用いてトランスフェクトした。細胞の培養および維持のための標準方法に従った。細胞は、それらが５０％コンフルエンシーに達したときに採取し、６ウェル、１２ウェルまたは２４ウェルプレート中で、各々２．５、１．０、または０．５ｍＬの増殖培地中の１２５，０００、５０，０００または２５，０００細胞でプレーティングした。翌日、増殖培地で細胞をすすぎ洗いし、４時間トランスフェクトした。１２ウェルプレートについては、４μｌの適切なトランスフェクション試薬を１００μｌの増殖培地と混合した。１μｇのレポーター構築物および解析されるべき受容体対の各受容体構築物０．２５μｇをトランスフェクション混合物へ添加した。チミジンキナーゼ（ＴＫ）構成性プロモーターと機能的に連結していてその制御下に置かれたウミシイタケ（Ｒｅｎｉｌｌａ）ルシフェラーゼ遺伝子を含む第２レポーター構築物［ｐＴＫＲＬ（Ｐｒｏｍｅｇａ），　０．１　μｇ／トランスフェクション混合物］を添加し、標準化のために使用した。トランスフェクション混合物の内容物をボルテックス・ミキサーで混合し、室温に３０分間静置した。インキュベーションの終了時に、４００μｌの増殖培地中に維持した細胞へトランスフェクション混合物を添加した。細胞は３７℃および５％　CO_2で４時間維持した。インキュベーションの終了時に、増殖培地５００μｌおよびジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ；対照）またはステロイドリガンドもしくは非ステロイドリガンドのＤＭＳＯ溶液のどちらかを加え、細胞を３７℃および５％　CO_2で４８時間維持した。細胞を採取し、レポーター活性をアッセイした。６ウェルプレートについては全試薬の量を２倍にし、２４ウェルプレートについては半量にすることを除いて、６および２４ウェルプレートについても同一方法を実施した。

【０２８４】
レポーターアッセイ：細胞は、リガンドの添加４８時間後に採取した。受動溶解バッファー１２５μｌ（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ製のデュアル－ルシフェラーゼ（商標）レポーターアッセイシステムの一部）を２４ウェルプレートの各ウェルに添加した。プレートはロータリーシェーカー上に１５分間置いた。２０μｌの溶解産物をアッセイした。ルシフェラーゼ活性は、Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ製のデュアル－ルシフェラーゼ（商標）レポーターアッセイシステムを使用して製造業者の取扱説明書にしたがって測定した。β－ガラクトシダーゼは、ＴＲＯＰＩＸ製のＧａｌａｃｔｏ　Ｓｔａｒ（商標）アッセイキットを使用して製造業者の取扱説明書にしたがって測定した。全ルシフェラーゼおよびガラクトシダーゼ活性は、標準物質としてウミシイタケルシフェラーゼを使用して標準化した。活性倍率は、リガンド処理された細胞における標準化された相対光単位（「ＲＬＵ」）をＤＭＳＯでの処理細胞（未処理対照）における標準化ＲＬＵで割ることによって計算した。結果は図１に提示したが、各バーの頂部の数字はその群の最大誘導倍率を示している。

【０２８５】
図１に示したように、ＢａＥｃＲ構築物は、ＣＢＷ細胞において試験した両方のリガンドを用いて用量依存性様式でレポーター遺伝子活性をトランス活性化することができた。しかし、Ｌ５７細胞内では、いずれのリガンドの存在下でもほんのわずかなトランス活性化しか生じなかった。本出願人らの以前の試験は、ＣＦＥｃＲおよびＤｍＥｃＲがどちらもＬ５７において良好なトランス活性化を引き起こすが、ＢａＥｃＲはこれらの細胞内では不良なトランス活性化因子であることを証明している。

【０２８６】
Ｂ）哺乳動物細胞：
手短には、ＢａＥｃＲ　ＤＥドメイン（配列番号：２のアミノ酸１１９～４１６）を次のようにＧＡＬ４　ＤＮＡ結合ドメイン（配列番号：１３）に融合させた。ＢａＥｃＲ－ＤＥポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（配列番号：１のヌクレオチド４５８～１３４９）をNH_2末端でＧＡＬ４　ＤＮＡ結合ドメインをコードするポリヌクレオチド（配列番号：１４）へ融合させることによって、１つの構築物を作製した。このＧＡＬ４／ＢａＥｃＲ融合は、その後サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター／エンハンサー（配列番号：１５）の制御下でクローン化させた。さらに、ガＣｈｏｒｉｓｔｏｎｅｕｒａ　ｆｕｍｉｆｅｒａｎａウルトラスピラクルタンパク質（「ＣｆＵＳＰ」，配列番号：１６）、ミバエＤｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒウルトラスピラクルタンパク質（「ＤｍＵＳＰ」；配列番号：１７）、バッタＬｏｃｕｓｔａ　ｍｉｇｒａｔｏｒｉａウルトラスピラクルタンパク質（ＬｍＵＳＰ；配列番号：１８）、マウスＭｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓレチノイドＸ受容体アイソフォームα（ＭｍＲＸＲα；配列番号：１９）、ＭｍＲＸＲαとＬｍＵＳＰの間のキメラＲＸＲ／ＵＳＰ（Ｃｈｉｍｅｒａ；配列番号：２０）、マダニＡｍｂｌｙｏｎｍｍａ　ａｍｅｒｉｃａｎｕｍレチノイドＸ受容体ホモログ１（ＡｍａＲＸＲ１；配列番号：２１）、およびマダニＡｍｂｌｙｏｍｍａ　ａｍｅｒｉｃａｎｕｍレチノイドＸ受容体ホモログ２（ＡｍａＲＸＲ２；配列番号：２２）からの７種のＲＸＲ／ＵＳＰのＥＦドメインをコードするポリヌクレオチドを各々ＶＰ１６トランス活性化ドメインをコードするポリヌクレオチド（配列番号：９）へ融合させた。

【０２８７】
ＧＡＬ４／ＢａＥｃＲ遺伝子発現カセットは、細胞を１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含む増殖培地中で培養し、トランスフェクション試薬としてＳｕｐｅｒｆｅｃｔ（商標）（Ｑｉａｇｅｎ製）を使用し、そしてインキュベーション／トランスフェクションの終了時に２０％　ＦＢＳを含有する５００μｌの増殖培地を細胞に添加したことを除いて、上述の通りに７つのＶＰ１６ＲＸＲ／ＵＳＰ遺伝子発現カセット各々と、並びに５ＸＧＡＬ４ＲＥ（１Ｘ　ＧＡＬ４ＲＥは配列番号：２３に示した）、合成ＴＡＴＡ（配列番号：２４）およびルシフェラーゼレポーター遺伝子（配列番号：２５）を含むレポーター構築物ｐＦＲＬｕｃと一緒にＮＩＨ３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ）内へトランスフェクトした。

【０２８８】
受容体の組み合わせを、０、０．２、１．０もしくは１０μｍのステロイドポナステロンＡ（ＰｏｎＡ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）または０、０．０４、０．２、１．０、もしくは１０μｍのＧＳ（商標）－Ｅの存在下でそれらがＮＩＨ３Ｔ３細胞内でｐＦＲＬｕｃをトランス活性化する能力について比較した。これらのリガンドはＤＭＳＯ中に溶解させ、対照群および処理群のどちらにおいてもＤＭＳＯの最終濃度は０．１％で維持した。結果は図２に提示したが、各バーの頂部の数字はその群の最大誘導倍率を示している。
【０２８９】
図２に示したように、ＢａＥｃＲは試験したＲＸＲ／ＵＳＰレポーター構築物のいずれと組み合わせてもレポーター遺伝子活性を誘導したので、これはＢａＥｃＲが哺乳動物細胞内で機能的であることを指示している。
【０２９０】
本発明は、ここに記載した特定実施形態によって範囲が限定されてはならない。実際に、当業者にはここに記載した実施形態に加えて上記の説明から本発明の様々な変形が明白になるであろう。そのような変形は添付の請求項の範囲内に含まれることが意図されている。
【０２９１】
さらにまた、すべての塩基のサイズまたはアミノ酸のサイズ、および核酸もしくはポリペプチドについて示したすべての分子量または分子質量値は近似値であり、説明のために提供されている。
【０２９２】
ここでは様々な出版物について言及するが、それらの開示はその全体が参照して組み込まれる。
【図面の簡単な説明】
【０２９３】
【図１】５ＸＥｃＲＥＬａｃＺおよびｐＦＲＥｃＲＥと一緒にＬ５７細胞またはＣＢＷ細胞内へトランスフェクトされたＶＰ１６／ＢａＥｃＲ－ＣＤＥ構築物を介しての、２０ＥまたはＧＳ（商標）－Ｅによるレポーター遺伝子のトランス活性化。バーの頂部の数字はＤＭＳＯでのレベルに対する増加倍率を示している。
【図２】ＶＰ１６／ＣｆＵＳＰ－ＥＦ、ＶＰ１６／ＤｍＵＳＰ－ＥＦ、ＶＰ１６／ＭｍＲＸＲα－ＥＦ、ＶＰ１６／ＭｍＲＸＲα／ＬｍＵＳＰ－ＥＦキメラ、ＶＰ１６／ＡｍａＲＸＲｌ－ＥＦ、またはＶＰ１６／ＡｍａＲＸＲ２－ＥＦ、およびｐＦＲＬｕｃと一緒にＮＩＨ３Ｔ３細胞内へトランスフェクトされたＧＡＬ４／ＢａＥｃＲ－ＤＥ構築物を介しての、ＰｏｎＡまたはＧＳ（商標）－Ｅによるレポーター遺伝子のトランス活性化。バーの頂部の数字はその群の最大誘導倍率を示している。

【図１】

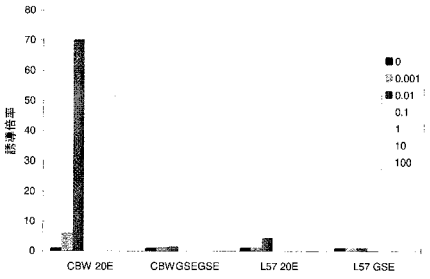

誘導倍率
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
CBW 20E
CBWGSEGSE
L57 20E
L57 GSE

図1

【図２】

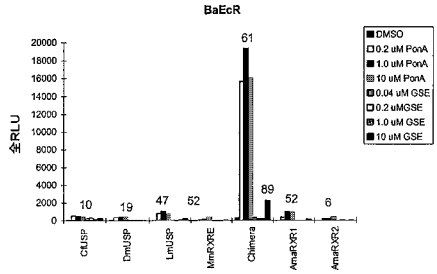

BaEcR
全RLU
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
DMSO
0.2 uM PonA
1.0 uM PonA
10 uM PonA
0.04 uM GSE
0.2 uMGSE
1.0 uM GSE
10 uM GSE
10
19
47
52
61
89
52
6
CfUSP
DmUSP
LmUSP
MmRXRE
Chimera
AmaRXR1
AmaRXR2

図2

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
3 April 2003 (03.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/027266 A2

(51) International Patent Classification⁷: C12N

(21) International Application Number: PCT/US02/05234

(22) International Filing Date: 20 February 2002 (20.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/325,534 26 September 2001 (26.09.2001) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **ROHM AND HAAS COMPANY** [US/US]; 100 Independence Mall West, Philadelphia, PA 19106-2399 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **ZHANG, Jianzhong** [CA/US]; #24-C-2 Lower State Road, North Wales, PA 19545 (US). **CRESS, Dean, Ervin** [US/US]; 104 Leslie Lane, Sounderton, PA 18964 (US). **PALLI, Subba, Reddy** [CA/US]; 832 Garfield Avenue, Lansdale, PA 19446 (US). **DHADIALLA, Tarlochan, Singh** [KE/US]; 108 Ridge Court, Chalfont, PA 18914 (US).

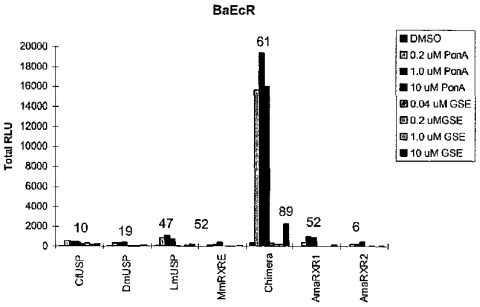
(74) Agent: **JOLLY-TORNETTA, Camille**; Rohm an Haas Company, 100 Independence Mall West, Philadelphia, PA 19106-2399 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: WHITEFLY ECDYSONE RECEPTOR NUCLEIC ACIDS, POLYPEPTIDES, AND USES THEREOF



(57) Abstract: The present invention relates to a novel isolated whitefly ecdysone receptor polypeptide. The invention also relates to an isolated nucleic acid encoding the whitefly ecdysone receptor polypeptide, to vectors comprising them and to their uses, in particular in methods for modulating gene expression in an ecdysone receptor-based gene expression modulation system and methods for identifying molecules that modulate whitefly ecdysone receptor activity.

WO 03/027266 A2

WO 03/027266 A2

Declaration under Rule 4.17:
— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WHITEFLY ECDYSONE RECEPTOR NUCLEIC ACIDS, POLYPEPTIDES, AND USES THEREOF

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to the field of biotechnology. Specifically, this invention relates to isolated nucleic acids, vectors comprising them, and polypeptides encoded by them, and to their use in the field of gene expression and insecticide discovery. More specifically, this invention relates to a novel nucleic acid encoding an ecdysone receptor polypeptide from the homopteran whitefly (*Bamecia argentifoli*, "BaEcR") and its use in methods of modulating the expression of a gene within a host cell using BaEcR, and in methods of identifying molecules that modulate the activity of the BaEcR.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Various publications are cited herein, the disclosures of which are incorporated by reference in their entireties. However, the citation of any reference herein should not be construed as an admission that such reference is available as "Prior Art" to the instant application.

Cultivated agriculture has greatly increased efficiency of food production in the world. However, various insect pests have found it advantageous to seek out and exploit cultivated sources of food to their own advantage. These insect pests typically develop by a temporal sequence of events which are characteristic of their order. Many insects initially develop in a caterpillar or maggot-like larval form. Thereafter, they undergo a significant metamorphosis from which an adult emerges having characteristic anatomical features. Anatomic similarity is a reflection of developmental, physiological and biochemical similarities shared by these creatures. In particular, the principles of the insect ecdysteroid-hormone receptors and development, as described by Ashburner et al. (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38:655-662, 1974), likely would be shared by many different types of insects.

To prevent or reduce the destruction of cultivated crops by insects, organic molecules with pesticidal properties are used commonly in attempts to eliminate or reduce the insect populations. However, the ecological side effects of these pesticides, due in part to their broad activity and lack of specificity, and in part, to the fact that some of these pesticides are not easily biodegradable, significantly affect populations of both insect and other species of animals. Some of these organisms may be advantageous from an ecological or other perspective. Furthermore, as the insect populations evolve in directions to minimize the effects of the applied pesticides, the amounts of pesticides applied are often elevated so high as to cause significant effects on other animals, including humans, which are affected directly or indirectly by the application of the pesticides. Thus, an important need exists for both highly specific pesticides or highly active pesticides which have biological effects only on the species of animals targeted by the pesticides, and are biodegradable. Novel insect hormones which, like the

ecdysteroids, act by complexing with insect members of the steroid receptor superfamily to control insect development, are likely candidates for pesticides with these desirable properties.

Growth, molting, and development in insects are regulated by the ecdysone steroid hormone (molting hormone) and the juvenile hormones (Dhadialla, et al., 1998, Annu. Rev. Entomol. 43: 545-569). The molecular target for ecdysone in insects consists of at least ecdysone receptor (EcR) and ultraspiracle protein (USP). EcR is a member of the nuclear steroid receptor super family that is characterized by signature DNA and ligand binding domains, and an activation domain (Koelle et al. 1991, Cell, 67:59-77). EcR receptors are responsive to a number of steroidal compounds such as ponasterone A and muristerone A. Recently, non-steroidal compounds with ecdysteroid agonist activity have been described, including the commercially available insecticides tebufenozide and methoxyfenozide (see International Patent Application No. PCT/EP96/00686 and US Patent 5,530,028). Both analogs have exceptional safety profiles to other organisms.

Polynucleotides encoding ecdysone receptors have been cloned from a variety of insect species, including Dipterans (see US patents 5,514,578 and 6,245,531 B1), Lepidopterans, Orthopterans, Hemipterans, and one Homopteran Aphid, all from the class Arthropod. In particular, EcRs have been cloned from spruce budworm *Choristoneura fumiferana* EcR ("CfEcR"; Kothapalli et al., 1995 Dev Genet. 17: 319-30), a yellow meal worm *Tenebrio molitor* EcR ("TmEcR"; Mouillet et al., 1997, Eur. J. biochem. 248: 856-863), a tobacco hormworm *Manduca sexta* EcR ("MsEcR"; Fujiwara et al., 1995, Insect Biochem. Molec. Biol. 25, 845-856), a tobacco budworm *Heliothies virescens* EcR ("HvEcR"; Martinez et al., 1999, *Insect Biochem Mol Biol.* 29: 915-30), a golmidge *Chironomus tentans* EcR ("CtEcR"; Imhof et al., 1993, Insect Biochem. Molec. Biol. 23, 115-124), a silkworm *Bombyx mori* EcR ("BmEcR"; Swevers et al., 1995, Insect Biochem. Molec. Biol. 25, 857-866), a squinting bush brown *Bicyclus anynana* EcR ("BanEcR"), a buckeye *Junonia coenia* EcR ("JcEcR"), a fruit fly *Drosophila melanogaster* EcR ("DmEcR"; Koelle et al., 1991, Cell 67, 59-77), a yellow fever mosquito *Aedes aegypti* EcR ("AaEcR"; Cho et al., 1995, Insect Biochem. Molec. Biol. 25, 19-27), a blowfly *Lucilia capitata* ("LcEcR"), a sheep blowfly *Lucilia cuprina* EcR ("LucEcR"; Hannan and Hill, 1997, Insect Biochem. Molec. Biol. 27, 479-488), a blowfly *Calliphora vicinia* EcR ("CvEcR"), a Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* EcR ("CcEcR"; Verras et al., 1999, *Eur J Biochem.* 265: 798-808), a locust *Locusta migratoria* EcR ("LmEcR"; Saleh et al., 1998, *Mol Cell Endocrinol.* 143: 91-9), an aphid *Myzus persicae* EcR ("MpEcR"; International Patent Application Publication WO99/36520), a fiddler crab *Celuca pugilator* EcR ("CpEcR"; Chung et al., 1998, *Mol Cell Endocrinol* 139: 209-27), and an ixodid tick *Amblyomma americanum* EcR ("AmaEcR"; Guo et al., 1997, Insect Biochem. Molec. Biol. 27: 945-962). The nucleotide and/or amino acid sequences of these ecdysone receptors have been determined and are publicly available.

The ecdysone receptor complex typically includes proteins that are members of the nuclear receptor superfamily wherein all members are generally characterized by the presence of an amino-

terminal transactivation domain, a DNA binding domain ("DBD"), and a ligand binding domain ("LBD") separated from the DBD by a hinge region. As used herein, the term "DNA binding domain" comprises a minimal polypeptide sequence of a DNA binding protein, up to the entire length of a DNA binding protein, so long as the DNA binding domain functions to associate with a particular response element. Members of the nuclear receptor superfamily are also characterized by the presence of four or five domains: A/B, C, D, E, and in some members F (see US patent 4,981,784 and Evans, *Science* 240:889-895 (1988)). The "A/B" domain corresponds to the transactivation domain, "C" corresponds to the DNA binding domain, "D" corresponds to the hinge region, and "E" corresponds to the ligand binding domain. Some members of the family may also have another transactivation domain on the carboxy-terminal side of the LBD corresponding to "F".

The DBD is characterized by the presence of two cysteine zinc fingers between which are two amino acid motifs, the P-box and the D-box, which confer specificity for ecdysone response elements. These domains may be either native, modified, or chimeras of different domains of heterologous receptor proteins. The EcR receptor, like a subset of the steroid receptor family, also possesses less well-defined regions responsible for heterodimerization properties. Because the domains of nuclear receptors are modular in nature, the LBD, DBD, and transactivation domains may be interchanged.

Gene switch systems are known that incorporate components from the ecdysone receptor complex. However, in these known systems, whenever EcR is used it is associated with native or modified DNA binding domains and transactivation domains on the same molecule. USP or RXR are typically used as silent partners. Applicants have previously shown that when DNA binding domains and transactivation domains are on the same molecule the background activity in the absence of ligand is high and that such activity is dramatically reduced when DNA binding domains and transactivation domains are on different molecules, that is, on each of two partners of a heterodimeric or homodimeric complex (see PCT/US01/09050).

The insect ecdysone receptor (EcR) heterodimerizes with Ultraspiracle (USP), the insect homologue of the mammalian RXR, and binds ecdysteroids and ecdysone receptor response elements and activates transcription of ecdysone responsive genes (Riddiford et al. 2000, Vitam Horm, 60: 1-73). The EcR/USP/ligand complexes play important roles during insect development and reproduction. The EcR is a member of the steroid hormone receptor superfamily and has five modular domains, A/B (transactivation), C (DNA binding, heterodimerization), D (Hinge, heterodimerization), E (ligand binding, heterodimerization and transactivation and in some cases, F (transactivation), domains. Some of these domains such as A/B, C and E retain their function when they are fused to other proteins.

Recently, ecdysone receptor based gene expression systems have been developed. Tightly regulated inducible gene expression systems or "gene switches" are useful for various applications such as gene therapy, large scale production of proteins in cells, cell based high throughput screening assays, functional genomics and regulation of traits in transgenic plants and animals. U.S. Patent No. 6,265,173

B1 discloses that various members of the steroid/thyroid superfamily of receptors can combine with *Drosophila melanogaster* ultraspiracle receptor (USP) or fragments thereof comprising at least the dimerization domain of USP for use in a gene expression system. U.S. Patent No. 5,880,333 discloses a *Drosophila melanogaster* EcR and ultraspiracle (USP) heterodimer system used in plants in which the transactivation domain and the DNA binding domain are positioned on two different hybrid proteins.

The first version of an EcR-based gene switch used *Drosophila melanogaster* EcR (DmEcR) and *Mus musculus* RXR (MmRXR) and showed that these receptors in the presence of steroid, ponasterone A, transactivate reporter genes in mammalian cell lines and transgenic mice (Christopherson et al. 1992, PNAS 89:6314-6318; No et al. 1996, PNAS 93:3346-3351). Later, Suhr et al. (1998, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 7999-8004) showed that non-steroidal ecdysone agonist, tebufenozide, induced high level of transactivation of reporter genes in mammalian cells through *Bombyx mori* EcR (BmEcR) in the absence of exogenous heterodimer partner.

International Patent Applications Nos. PCT/US97/05330 (WO 97/38117) and PCT/US99/08381 (WO99/58155) disclose methods for modulating the expression of an exogenous gene in which a DNA construct comprising the exogenous gene and an ecdysone response element is activated by a second DNA construct comprising an ecdysone receptor that, in the presence of a ligand therefor, and optionally in the presence of a receptor capable of acting as a silent partner, binds to the ecdysone response element to induce gene expression. The ecdysone receptor of choice was isolated from *Drosophila melanogaster*. Typically, such systems require the presence of the silent partner, preferably retinoid X receptor (RXR), in order to provide optimum activation. In mammalian cells, insect ecdysone receptor (EcR) heterodimerizes with retinoid X receptor (RXR) and regulates expression of target genes in a ligand dependent manner. International Patent Application No. PCT/US98/14215 (WO 99/02683) discloses that the ecdysone receptor isolated from the silk moth *Bombyx mori* is functional in mammalian systems without the need for an exogenous dimer partner.

Unfortunately, these USP-based systems are constitutive in animal cells and therefore, are not effective for regulating reporter gene expression. Drawbacks of the above described EcR-based gene regulation systems include a considerable background activity in the absence of ligands and non-applicability of these systems for use in both plants and animals (see U.S. Patent No. 5,880,333).

Recently, an improved ecdysone receptor-based inducible gene expression system has been developed in which the transactivation and DNA binding domains are separated from each other by placing them on two different proteins results in greatly reduced background activity in the absence of a ligand and significantly increased activity over background in the presence of a ligand (pending application PCT/US01/09050, incorporated herein in its entirety by reference). This two-hybrid system is a significantly improved inducible gene expression modulation system compared to the two systems disclosed in applications PCT/US97/05330 and PCT/US98/14215. The two-hybrid system exploits the ability of a pair of interacting proteins to bring the transcription activation domain into a more favorable

position relative to the DNA binding domain such that when the DNA binding domain binds to the DNA binding site on the gene, the transactivation domain more effectively activates the promoter (see, for example, U.S. Patent No. 5,283,173). Briefly, the two-hybrid gene expression system comprises two gene expression cassettes; the first encoding a DNA binding domain fused to a nuclear receptor polypeptide, and the second encoding a transactivation domain fused to a different nuclear receptor polypeptide. In the presence of ligand, the interaction of the first polypeptide with the second polypeptide effectively tethers the DNA binding domain to the transactivation domain. Since the DNA binding and transactivation domains reside on two different molecules, the background activity in the absence of ligand is greatly reduced.

A two-hybrid system also provides improved sensitivity to non-steroidal ligands for example, diacylhydrazines, when compared to steroidal ligands for example, ponasterone A ("PonA") or muristerone A ("MurA"). That is, when compared to steroids, the non-steroidal ligands provide higher activity at a lower concentration. In addition, since transactivation based on EcR gene switches is often cell-line dependent, it is easier to tailor switching systems to obtain maximum transactivation capability for each application. Furthermore, the two-hybrid system avoids some side effects due to overexpression of RXR that often occur when unmodified RXR is used as a switching partner. In a preferred two-hybrid system, native DNA binding and transactivation domains of EcR or RXR are eliminated and as a result, these hybrid molecules have less chance of interacting with other steroid hormone receptors present in the cell resulting in reduced side effects.

Applicants have now obtained and determined the full-length coding sequence of an additional homopteran EcR polynucleotide from whitefly for use in methods of modulating gene expression in a host cell and methods of identifying molecules that modulate activity of whitefly EcR. As described herein, Applicants' invention provides novel whitefly ecdysone receptor polypeptides and novel polynucleotides encoding these polypeptides that are useful as components of gene expression systems for highly specific regulation of recombinant proteins in host cells or in methods for identifying new molecules which may act as agonists or antagonists of a homopteran insect ecdysone receptor.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1: Transactivation of reporter genes through VP16/BaEcR-CDE construct transfected into L57 cells or CBW cells along with 5XEcRELacZ and pFREcRE by 20E or GS™-E. The numbers on top of the bars indicate fold increase over DMSO levels.

Figure 2: Transactivation of reporter genes through GAL4/BaEcR-DE construct transfected into NIH3T3 cells along with VP16/CfUSP-EF, VP16/DmUSP-EF, VP16/MmRXRα-EF, VP16/MmRXRα/LmUSP-EF chimera, VP16/AmaRXR1-EF, or VP16/AmaRXR2-EF, and pFRLuc by PonA or GS™-E. The numbers on top of the bars indicate the maximum fold induction for that group.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention advantageously provides an isolated polynucleotide encoding a novel whitefly ecdysone receptor polypeptide. The polynucleotides and polypeptides of the present invention are useful in methods to regulate gene expression of a polypeptide of interest in a host cell and in identifying new molecules that modulate activity of a whitefly EcR.

The various aspects of the invention will be set forth in greater detail in the following sections, directed to the nucleic acids, polypeptides, vectors, antibodies, compositions, and methods of use of the invention. This organization into various sections is intended to facilitate understanding of the invention, and is in no way intended to be limiting thereof.

Definitions

The following defined terms are used throughout the present specification, and should be helpful in understanding the scope and practice of the present invention.

In a specific embodiment, the term "about" or "approximately" means within 20%, preferably within 10%, more preferably within 5%, and even more preferably within 1% of a given value or range.

The term "substantially free" means that a composition comprising "A" (where "A" is a single protein, DNA molecule, vector, recombinant host cell, etc.) is substantially free of "B" (where "B" comprises one or more contaminating proteins, DNA molecules, vectors, etc.) when at least about 75% by weight of the proteins, DNA, vectors (depending on the category of species to which A and B belong) in the composition is "A". Preferably, "A" comprises at least about 90% by weight of the A + B species in the composition, most preferably at least about 99% by weight. It is also preferred that a composition, which is substantially free of contamination, contain only a single molecular weight species having the activity or characteristic of the species of interest.

The term "isolated" for the purposes of the present invention designates a biological material (nucleic acid or protein) that has been removed from its original environment (the environment in which it is naturally present). For example, a polynucleotide present in the natural state in a plant or an animal is not isolated, however the same polynucleotide separated from the adjacent nucleic acids in which it is naturally present, is considered "isolated". The term "purified" does not require the material to be present in a form exhibiting absolute purity, exclusive of the presence of other compounds. It is rather a relative definition.

A polynucleotide is in the "purified" state after purification of the starting material or of the natural material by at least one order of magnitude, preferably 2 or 3 and preferably 4 or 5 orders of magnitude.

As used herein, the term "substantially pure" describes a polypeptide or other material which has

been separated from its native contaminants. Typically, a monomeric polypeptide is substantially pure when at least about 60 to 75% of a sample exhibits a single polypeptide backbone. Minor variants or chemical modifications typically share the same polypeptide sequence. Usually a substantially pure polypeptide will comprise over about 85 to 90% of a polypeptide sample, and preferably will be over about 99% pure. Normally, purity is measured on a polyacrylamide gel, with homogeneity determined by staining. Alternatively, for certain purposes high resolution will be necessary and HPLC or a similar means for purification will be used. For most purposes, a simple chromatography column or polyacrylamide gel will be used to determine purity.

The term "substantially free of naturally-associated host cell components" describes a polypeptide or other material which is separated from the native contaminants which accompany it in its natural host cell state. Thus, a polypeptide which is chemically synthesized or synthesized in a cellular system different from the host cell from which it naturally originates will be free from its naturally-associated host cell components.

The terms "nucleic acid" or "polynucleotide" are used interchangeably herein to refer to a polymeric compound comprised of covalently linked subunits called nucleotides. Nucleic acid includes polyribonucleic acid (RNA) and polydeoxyribonucleic acid (DNA), both of which may be single-stranded or double-stranded. DNA includes but is not limited to cDNA, genomic DNA, plasmids DNA, synthetic DNA, and semi-synthetic DNA. DNA may be linear, circular, or supercoiled.

A "nucleic acid molecule" refers to the phosphate ester polymeric form of ribonucleosides (adenosine, guanosine, uridine or cytidine; "RNA molecules") or deoxyribonucleosides (deoxyadenosine, deoxyguanosine, deoxythymidine, or deoxycytidine; "DNA molecules"), or any phosphoester analogs thereof, such as phosphorothioates and thioesters, in either single stranded form, or a double-stranded helix. Double stranded DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA helices are possible. The term nucleic acid molecule, and in particular DNA or RNA molecule, refers only to the primary and secondary structure of the molecule, and does not limit it to any particular tertiary forms. Thus, this term includes double-stranded DNA found, *inter alia*, in linear or circular DNA molecules (*e.g.*, restriction fragments), plasmids, and chromosomes. In discussing the structure of particular double-stranded DNA molecules, sequences may be described herein according to the normal convention of giving only the sequence in the 5' to 3' direction along the non-transcribed strand of DNA (*i.e.*, the strand having a sequence homologous to the mRNA). A "recombinant DNA molecule" is a DNA molecule that has undergone a molecular biological manipulation.

The term "fragment" will be understood to mean a nucleotide sequence of reduced length relative to the reference nucleic acid and comprising, over the common portion, a nucleotide sequence identical to the reference nucleic acid. Such a nucleic acid fragment according to the invention may be, where appropriate, included in a larger polynucleotide of which it is a constituent. Such fragments comprise, or alternatively consist of, oligonucleotides ranging in length from at least 6-1100 consecutive

nucleotides of a nucleic acid according to the invention.

As used herein, an "isolated nucleic acid fragment" is a polymer of RNA or DNA that is single- or double-stranded, optionally containing synthetic, non-natural or altered nucleotide bases. An isolated nucleic acid fragment in the form of a polymer of DNA may be comprised of one or more segments of cDNA, genomic DNA or synthetic DNA.

A "gene" refers to an assembly of nucleotides that encode a polypeptide, and includes cDNA and genomic DNA nucleic acids. "Gene" also refers to a nucleic acid fragment that expresses a specific protein or polypeptide, including regulatory sequences preceding (5' non-coding sequences) and following (3' non-coding sequences) the coding sequence. "Native gene" refers to a gene as found in nature with its own regulatory sequences. "Chimeric gene" refers to any gene that is not a native gene, comprising regulatory and/or coding sequences that are not found together in nature. Accordingly, a chimeric gene may comprise regulatory sequences and coding sequences that are derived from different sources, or regulatory sequences and coding sequences derived from the same source, but arranged in a manner different than that found in nature. A chimeric gene may comprise coding sequences derived from different sources and/or regulatory sequences derived from different sources. "Endogenous gene" refers to a native gene in its natural location in the genome of an organism. A "foreign" gene or "heterologous" gene refers to a gene not normally found in the host organism, but that is introduced into the host organism by gene transfer. Foreign genes can comprise native genes inserted into a non-native organism, or chimeric genes. A "transgene" is a gene that has been introduced into the genome by a transformation procedure.

"Heterologous" DNA refers to DNA not naturally located in the cell, or in a chromosomal site of the cell. Preferably, the heterologous DNA includes a gene foreign to the cell.

The term "genome" includes chromosomal as well as mitochondrial, chloroplast and viral DNA or RNA.

A nucleic acid molecule is "hybridizable" to another nucleic acid molecule, such as a cDNA, genomic DNA, or RNA, when a single stranded form of the nucleic acid molecule can anneal to the other nucleic acid molecule under the appropriate conditions of temperature and solution ionic strength (see Sambrook *et al.*, 1989 *infra*). Hybridization and washing conditions are well known and exemplified in Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989), particularly Chapter 11 and Table 11.1 therein (entirely incorporated herein by reference). The conditions of temperature and ionic strength determine the "stringency" of the hybridization.

Stringency conditions can be adjusted to screen for moderately similar fragments, such as homologous sequences from distantly related organisms, to highly similar fragments, such as genes that duplicate functional enzymes from closely related organisms. For preliminary screening for homologous nucleic acids, low stringency hybridization conditions, corresponding to a T_m of 55°, can be used, *e.g.*, 5x

SSC, 0.1% SDS, 0.25% milk, and no formamide; or 30% formamide, 5x SSC, 0.5% SDS). Moderate stringency hybridization conditions correspond to a higher T_m, *e.g.*, 40% formamide, with 5x or 6x SCC. High stringency hybridization conditions correspond to the highest T_m, *e.g.*, 50% formamide, 5x or 6x SCC.

Hybridization requires that the two nucleic acids contain complementary sequences, although depending on the stringency of the hybridization, mismatches between bases are possible. The term "complementary" is used to describe the relationship between nucleotide bases that are capable of hybridizing to one another. For example, with respect to DNA, adenosine is complementary to thymine and cytosine is complementary to guanine. Accordingly, the instant invention also includes isolated nucleic acid fragments that are complementary to the complete sequences as disclosed or used herein as well as those substantially similar nucleic acid sequences.

In a specific embodiment of the invention, polynucleotides are detected by employing hybridization conditions comprising a hybridization step at T_m of 55°C, and utilizing conditions as set forth above. In a preferred embodiment, the T_m is 60°C; in a more preferred embodiment, the T_m is 63°C; in an even more preferred embodiment, the T_m is 65°C.

Post-hybridization washes also determine stringency conditions. One set of preferred conditions uses a series of washes starting with 6X SSC, 0.5% SDS at room temperature for 15 minutes (min), then repeated with 2X SSC, 0.5% SDS at 45°C for 30 minutes, and then repeated twice with 0.2X SSC, 0.5% SDS at 50°C for 30 minutes. A more preferred set of stringent conditions uses higher temperatures in which the washes are identical to those above except for the temperature of the final two 30 min washes in 0.2X SSC, 0.5% SDS was increased to 60°C. Another preferred set of highly stringent conditions uses two final washes in 0.1X SSC, 0.1% SDS at 65°C.

The appropriate stringency for hybridizing nucleic acids depends on the length of the nucleic acids and the degree of complementation, variables well known in the art. The greater the degree of similarity or homology between two nucleotide sequences, the greater the value of T_m for hybrids of nucleic acids having those sequences. The relative stability (corresponding to higher T_m) of nucleic acid hybridizations decreases in the following order: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. For hybrids of greater than 100 nucleotides in length, equations for calculating T_m have been derived (see Sambrook *et al.*, *supra*, 9.50-0.51). For hybridization with shorter nucleic acids, *i.e.*, oligonucleotides, the position of mismatches becomes more important, and the length of the oligonucleotide determines its specificity (see Sambrook et al., *supra*, 11.7-11.8).

Selectivity of hybridization exists when hybridization occurs which is more selective than total lack of specificity. Typically, selective hybridization will occur when there is at least about 55% homology over a stretch of at least about 14/25 nucleotides, preferably at least about 65%, more preferably at least about 75%, and most preferably at least about 90%. See, Kanehisa, M. (1984), Nucleic Acids Res. 12:203-213, which is incorporated herein by reference. Stringent hybridization conditions

will typically include salt concentrations of less than about 1 M, more usually less than about 500 mM and preferably less than about 200 mM. Temperature conditions will typically be greater than 20 degrees Celsius, more usually greater than about 30 degrees Celsius and preferably in excess of about 37 degrees Celsius. As other factors may significantly affect the stringency of hybridization, including, among others, base composition and size of the complementary strands, presence of organic solvents and extent of base mismatching, the combination of parameters is more important than the absolute measure of any one.

In a specific embodiment of the invention, polynucleotides of the invention are detected by employing hybridization conditions comprising a hybridization step in less than 500 mM salt and at least 37 degrees Celsius, and a washing step in 2XSSPE at least 63 degrees Celsius. In a preferred embodiment, the hybridization conditions comprise less than 200 mM salt and at least 37 degrees Celsius for the hybridization step. In a more preferred embodiment, the hybridization conditions comprise 2XSSPE and 63 degrees Celsius for both the hybridization and washing steps.

In one embodiment, the length for a hybridizable nucleic acid is at least about 10 nucleotides. Preferable a minimum length for a hybridizable nucleic acid is at least about 15 nucleotides; more preferably at least about 20 nucleotides; and even more preferably the length is at least 30 nucleotides. Furthermore, the skilled artisan will recognize that the temperature and wash solution salt concentration may be adjusted as necessary according to factors such as length of the probe.

The term "probe" refers to a single-stranded nucleic acid molecule that can base pair with a complementary single stranded target nucleic acid to form a double-stranded molecule.

As used herein, the term "oligonucleotide" refers to a nucleic acid, generally of at least 18 nucleotides, that is hybridizable to a genomic DNA molecule, a cDNA molecule, a plasmid DNA or an mRNA molecule. Oligonucleotides can be labeled, *e.g.*, with ^{32}P-nucleotides or nucleotides to which a label, such as biotin, has been covalently conjugated. A labeled oligonucleotide can be used as a probe to detect the presence of a nucleic acid. Oligonucleotides (one or both of which may be labeled) can be used as PCR primers, either for cloning full length or a fragment of a nucleic acid, or to detect the presence of a nucleic acid. An oligonucleotide can also be used to form a triple helix with a DNA molecule. Generally, oligonucleotides are prepared synthetically, preferably on a nucleic acid synthesizer. Accordingly, oligonucleotides can be prepared with non-naturally occurring phosphoester analog bonds, such as thioester bonds, etc.

A "primer" is an oligonucleotide that hybridizes to a target nucleic acid sequence to create a double stranded nucleic acid region that can serve as an initiation point for DNA synthesis under suitable conditions. Such primers may be used in a polymerase chain reaction.

"Polymerase chain reaction" is abbreviated PCR and means an *in vitro* method for enzymatically amplifying specific nucleic acid sequences. PCR involves a repetitive series of temperature cycles with each cycle comprising three stages: denaturation of the template nucleic acid to separate the strands of

the target molecule, annealing a single stranded PCR oligonucleotide primer to the template nucleic acid, and extension of the annealed primer(s) by DNA polymerase. PCR provides a means to detect the presence of the target molecule and, under quantitative or semi-quantitative conditions, to determine the relative amount of that target molecule within the starting pool of nucleic acids.

"Reverse transcription-polymerase chain reaction" is abbreviated RT-PCR and means an *in vitro* method for enzymatically producing a target cDNA molecule or molecules from an RNA molecule or molecules, followed by enzymatic amplification of a specific nucleic acid sequence or sequences within the target cDNA molecule or molecules as described above. RT-PCR also provides a means to detect the presence of the target molecule and, under quantitative or semi-quantitative conditions, to determine the relative amount of that target molecule within the starting pool of nucleic acids.

A DNA "coding sequence" is a double-stranded DNA sequence that is transcribed and translated into a polypeptide in a cell *in vitro* or *in vivo* when placed under the control of appropriate regulatory sequences. "Suitable regulatory sequences" refer to nucleotide sequences located upstream (5' non-coding sequences), within, or downstream (3' non-coding sequences) of a coding sequence, and which influence the transcription, RNA processing or stability, or translation of the associated coding sequence. Regulatory sequences may include promoters, translation leader sequences, introns, polyadenylation recognition sequences, RNA processing site, effector binding site and stem-loop structure. The boundaries of the coding sequence are determined by a start codon at the 5' (amino) terminus and a translation stop codon at the 3' (carboxyl) terminus. A coding sequence can include, but is not limited to, prokaryotic sequences, cDNA from mRNA, genomic DNA sequences, and even synthetic DNA sequences. If the coding sequence is intended for expression in a eukaryotic cell, a polyadenylation signal and transcription termination **sequence will usually be located 3' to the coding sequence.**

"Open reading frame" is abbreviated ORF and means a length of nucleic acid sequence, either DNA, cDNA or RNA, that comprises a translation start signal or initiation codon, such as an ATG or AUG, and a termination codon and can be potentially translated into a polypeptide sequence.

The term "head-to-head" is used herein to describe the orientation of two polynucleotide sequences in relation to each other. Two polynucleotides are positioned in a head-to-head orientation when the 5' end of the coding strand of one polynucleotide is adjacent to the 5' end of the coding strand of the other polynucleotide, whereby the direction of transcription of each polynucleotide proceeds away from the 5' end of the other polynucleotide. The term "head-to-head" may be abbreviated (5')-to-(5') and may also be indicated by the symbols (← →) or (3'←5'5'→3').

The term "tail-to-tail" is used herein to describe the orientation of two polynucleotide sequences in relation to each other. Two polynucleotides are positioned in a tail-to-tail orientation when the 3' end of the coding strand of one polynucleotide is adjacent to the 3' end of the coding strand of the other polynucleotide, whereby the direction of transcription of each polynucleotide proceeds toward the other polynucleotide. The term "tail-to-tail" may be abbreviated (3')-to-(3') and may also be indicated by the

symbols (→ ←) or (5'→3'3'←5').

The term "head-to-tail" is used herein to describe the orientation of two polynucleotide sequences in relation to each other. Two polynucleotides are positioned in a head-to-tail orientation when the 5' end of the coding strand of one polynucleotide is adjacent to the 3' end of the coding strand of the other polynucleotide, whereby the direction of transcription of each polynucleotide proceeds in the same direction as that of the other polynucleotide. The term "head-to-tail" may be abbreviated (5')-to-(3') and may also be indicated by the symbols (→ →) or (5'→3'5'→3').

The term "downstream" refers to a nucleotide sequence that is located 3' to reference nucleotide sequence. In particular, downstream nucleotide sequences generally relate to sequences that follow the starting point of transcription. For example, the translation initiation codon of a gene is located downstream of the start site of transcription.

The term "upstream" refers to a nucleotide sequence that is located 5' to reference nucleotide sequence. In particular, upstream nucleotide sequences generally relate to sequences that are located on the 5' side of a coding sequence or starting point of transcription. For example, most promoters are located upstream of the start site of transcription.

The terms "restriction endonuclease" and "restriction enzyme" refer to an enzyme that binds and cuts within a specific nucleotide sequence within double stranded DNA.

"Homologous recombination" refers to the insertion of a foreign DNA sequence into another DNA molecule, e.g., insertion of a vector in a chromosome. Preferably, the vector targets a specific chromosomal site for homologous recombination. For specific homologous recombination, the vector will contain sufficiently long regions of homology to sequences of the chromosome to allow complementary binding and incorporation of the vector into the chromosome. Longer regions of homology, and greater degrees of sequence similarity, may increase the efficiency of homologous recombination.

Several methods known in the art may be used to propagate a polynucleotide according to the invention. Once a suitable host system and growth conditions are established, recombinant expression vectors can be propagated and prepared in quantity. As described herein, the expression vectors which can be used include, but are not limited to, the following vectors or their derivatives: human or animal viruses such as vaccinia virus or adenovirus; insect viruses such as baculovirus; yeast vectors; bacteriophage vectors (*e.g.*, lambda), and plasmid and cosmid DNA vectors, to name but a few.

A "vector" is any means for the cloning of and/or transfer of a nucleic acid into a host cell. A vector may be a replicon to which another DNA segment may be attached so as to bring about the replication of the attached segment. A "replicon" is any genetic element (e.g., plasmid, phage, cosmid, chromosome, virus) that functions as an autonomous unit of DNA replication *in vivo*, *i.e.*, capable of replication under its own control. The term "vector" includes both viral and nonviral means for introducing the nucleic acid into a cell *in vitro*, *ex vivo* or *in vivo*. A large number of vectors known in

the art may be used to manipulate nucleic acids, incorporate response elements and promoters into genes, etc. Possible vectors include, for example, plasmids or modified viruses including, for example bacteriophages such as lambda derivatives, or plasmids such as pBR322 or pUC plasmid derivatives, or the Bluescript vector. For example, the insertion of the DNA fragments corresponding to response elements and promoters into a suitable vector can be accomplished by ligating the appropriate DNA fragments into a chosen vector that has complementary cohesive termini. Alternatively, the ends of the DNA molecules may be enzymatically modified or any site may be produced by ligating nucleotide sequences (linkers) into the DNA termini. Such vectors may be engineered to contain selectable marker genes that provide for the selection of cells that have incorporated the marker into the cellular genome. Such markers allow identification and/or selection of host cells that incorporate and express the proteins encoded by the marker.

Viral vectors, and particularly retroviral vectors, have been used in a wide variety of gene delivery applications in cells, as well as living animal subjects. Viral vectors that can be used include but are not limited to retrovirus, adeno-associated virus, pox, baculovirus, vaccinia, herpes simplex, Epstein-Barr, adenovirus, geminivirus, and caulimovirus vectors. Non-viral vectors include plasmids, liposomes, electrically charged lipids (cytofectins), DNA-protein complexes, and biopolymers. In addition to a nucleic acid, a vector may also comprise one or more regulatory regions, and/or selectable markers useful in selecting, measuring, and monitoring nucleic acid transfer results (transfer to which tissues, duration of expression, etc.).

The term "plasmid" refers to an extra chromosomal element often carrying a gene that is not part of the central metabolism of the cell, and usually in the form of circular double-stranded DNA molecules. Such elements may be autonomously replicating sequences, genome integrating sequences, phage or nucleotide sequences, linear, circular, or supercoiled, of a single- or double-stranded DNA or RNA, derived from any source, in which a number of nucleotide sequences have been joined or recombined into a unique construction which is capable of introducing a promoter fragment and DNA sequence for a selected gene product along with appropriate 3' untranslated sequence into a cell.

A "cloning vector" is a "replicon", which is a unit length of a nucleic acid, preferably DNA, that replicates sequentially and which comprises an origin of replication, such as a plasmid, phage or cosmid, to which another nucleic acid segment may be attached so as to bring about the replication of the attached segment. Cloning vectors may be capable of replication in one cell type and expression in another ("shuttle vector").

Vectors may be introduced into the desired host cells by methods known in the art, *e.g.*, transfection, electroporation, microinjection, transduction, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, lipofection (lysosome fusion), particle bombardment, use of a gene gun, or a DNA vector transporter (see, *e.g.*, Wu et al., 1992, J. Biol. Chem. 267: 963-967; Wu and Wu, 1988, J. Biol. Chem. 263: 14621-14624; and Hartmut et al., Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed March 15,

1990).

A polynucleotide according to the invention can also be introduced *in vivo* by lipofection. For the past decade, there has been increasing use of liposomes for encapsulation and transfection of nucleic acids *in vitro*. Synthetic cationic lipids designed to limit the difficulties and dangers encountered with liposome mediated transfection can be used to prepare liposomes for *in vivo* transfection of a gene encoding a marker (Felgner et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 7413; Mackey, et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 8027-8031; and Ulmer et al., 1993, Science 259: 1745-1748). The use of cationic lipids may promote encapsulation of negatively charged nucleic acids, and also promote fusion with negatively charged cell membranes (Felgner and Ringold, 1989, Science 337: 387-388). Particularly useful lipid compounds and compositions for transfer of nucleic acids are described in International Patent Publications WO95/18863 and WO96/17823, and in U.S. Patent No. 5,459,127. The use of lipofection to introduce exogenous genes into the specific organs *in vivo* has certain practical advantages. Molecular targeting of liposomes to specific cells represents one area of benefit. It is clear that directing transfection to particular cell types would be particularly preferred in a tissue with cellular heterogeneity, such as pancreas, liver, kidney, and the brain. Lipids may be chemically coupled to other molecules for the purpose of targeting (Mackey, et al., 1988, *supra*). Targeted peptides, *e.g.*, hormones or neurotransmitters, and proteins such as antibodies, or non-peptide molecules could be coupled to liposomes chemically.

Other molecules are also useful for facilitating transfection of a nucleic acid *in vivo*, such as a cationic oligopeptide (*e.g.*, WO95/21931), peptides derived from DNA binding proteins (*e.g.*, WO96/25508), or a cationic polymer (*e.g.*, WO95/21931).

It is also possible to introduce a vector *in vivo* as a naked DNA plasmid (see U.S. Patents 5,693,622, 5,589,466 and 5,580,859). Receptor-mediated DNA delivery approaches can also be used (Curiel et al., 1992, Hum. Gene Ther. 3: 147-154; and Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432).

The term "transfection" means the uptake of exogenous or heterologous RNA or DNA by a cell. A cell has been "transfected" by exogenous or heterologous RNA or DNA when such RNA or DNA has been introduced inside the cell. A cell has been "transformed" by exogenous or heterologous RNA or DNA when the transfected RNA or DNA effects a phenotypic change. The transforming RNA or DNA can be integrated (covalently linked) into chromosomal DNA making up the genome of the cell.

"Transformation" refers to the transfer of a nucleic acid fragment into the genome of a host organism, resulting in genetically stable inheritance. Host organisms containing the transformed nucleic acid fragments are referred to as "transgenic" or "recombinant" or "transformed" organisms.

The term "genetic region" will refer to a region of a nucleic acid molecule or a nucleotide sequence that comprises a gene encoding a polypeptide.

In addition, the recombinant vector comprising a polynucleotide according to the invention may

include one or more origins for replication in the cellular hosts in which their amplification or their expression is sought, markers or selectable markers.

The term "selectable marker" means an identifying factor, usually an antibiotic or chemical resistance gene, that is able to be selected for based upon the marker gene's effect, *i.e.*, resistance to an antibiotic, resistance to a herbicide, colorimetric markers, enzymes, fluorescent markers, and the like, wherein the effect is used to track the inheritance of a nucleic acid of interest and/or to identify a cell or organism that has inherited the nucleic acid of interest. Examples of selectable marker genes known and used in the art include: genes providing resistance to ampicillin, streptomycin, gentamycin, kanamycin, hygromycin, bialaphos herbicide, sulfonamide, and the like; and genes that are used as phenotypic markers, *i.e.*, anthocyanin regulatory genes, isopentanyl transferase gene, and the like. Selectable marker genes may also be considered reporter genes.

The term "reporter gene" means a nucleic acid encoding an identifying factor that is able to be identified based upon the reporter gene's effect, wherein the effect is used to track the inheritance of a nucleic acid of interest, to identify a cell or organism that has inherited the nucleic acid of interest, and/or to measure gene expression induction or transcription. Examples of reporter genes known and used in the art include: luciferase (Luc), green fluorescent protein (GFP), chloramphenicol acetyltransferase (CAT), β-galactosidase (LacZ), β-glucuronidase (Gus), and the like.

"Promoter" refers to a DNA sequence capable of controlling the expression of a coding sequence or functional RNA. In general, a coding sequence is located 3' to a promoter sequence. Promoters may be derived in their entirety from a native gene, or be composed of different elements derived from different promoters found in nature, or even comprise synthetic DNA segments. It is understood by those skilled in the art that different promoters may direct the expression of a gene in different tissues or cell types, or at different stages of development, or in response to different environmental or physiological conditions. Promoters that cause a gene to be expressed in most cell types at most times are commonly referred to as "constitutive promoters". Promoters that cause a gene to be expressed in a specific cell type are commonly referred to as "cell-specific promoters" or "tissue-specific promoters". Promoters that cause a gene to be expressed at a specific stage of development or cell differentiation are commonly referred to as "developmentally-specific promoters" or "cell differentiation-specific promoters". Promoters that are induced and cause a gene to be expressed following exposure or treatment of the cell with an agent, biological molecule, chemical, ligand, light, or the like that induces the promoter are commonly referred to as "inducible promoters" or "regulatable promoters". It is further recognized that since in most cases the exact boundaries of regulatory sequences have not been completely defined, DNA fragments of different lengths may have identical promoter activity.

A "promoter sequence" is a DNA regulatory region capable of binding RNA polymerase in a cell and initiating transcription of a downstream (3' direction) coding sequence. For purposes of defining the present invention, the promoter sequence is bounded at its 3' terminus by the transcription initiation site

and extends upstream (5' direction) to include the minimum number of bases or elements necessary to initiate transcription at levels detectable above background. Within the promoter sequence will be found a transcription initiation site (conveniently defined for example, by mapping with nuclease S1), as well as protein binding domains (consensus sequences) responsible for the binding of RNA polymerase.

A coding sequence is "under the control" of transcriptional and translational control sequences in a cell when RNA polymerase transcribes the coding sequence into mRNA, which is then trans-RNA spliced (if the coding sequence contains introns) and translated into the protein encoded by the coding sequence.

"Transcriptional and translational control sequences" are DNA regulatory sequences, such as promoters, enhancers, terminators, and the like, that provide for the expression of a coding sequence in a host cell. In eukaryotic cells, polyadenylation signals are control sequences.

The term "response element" means one or more cis-acting DNA elements which confer responsiveness on a promoter mediated through interaction with the DNA-binding domains of the first chimeric gene. This DNA element may be either palindromic (perfect or imperfect) in its sequence or composed of sequence motifs or half sites separated by a variable number of nucleotides. The half sites can be similar or identical and arranged as either direct or inverted repeats or as a single half site or multimers of adjacent half sites in tandem. The response element may comprise a minimal promoter isolated from different organisms depending upon the nature of the cell or organism into which the response element will be incorporated. The DNA binding domain of the first hybrid protein binds, in the presence or absence of a ligand, to the DNA sequence of a response element to initiate or suppress transcription of downstream gene(s) under the regulation of this response element. Examples of DNA sequences for response elements of the natural ecdysone receptor include: RRGG/TTCANTGAC/ACYY (see Cherbas L., et. al., (1991), *Genes Dev.* 5, 120-131); AGGTCA$N_{(n)}$AGGTCA,where $N_{(n)}$ can be one or more spacer nucleotides (see D'Avino PP., et. al., (1995), *Mol. Cell. Endocrinol,* 113, 1-9); and GGGTTGAATGAATTT (see Antoniewski C., et. al., (1994). Mol. Cell Biol. 14, 4465-4474).

The term "operably linked" refers to the association of nucleic acid sequences on a single nucleic acid fragment so that the function of one is affected by the other. For example, a promoter is operably linked with a coding sequence when it is capable of affecting the expression of that coding sequence (i.e., that the coding sequence is under the transcriptional control of the promoter). Coding sequences can be operably linked to regulatory sequences in sense or antisense orientation.

The term "expression", as used herein, refers to the transcription and stable accumulation of sense (mRNA) or antisense RNA derived from a nucleic acid or polynucleotide. Expression may also refer to translation of mRNA into a protein or polypeptide.

The terms "cassette", "expression cassette" and "gene expression cassette" refer to a segment of DNA that can be inserted into a nucleic acid or polynucleotide at specific restriction sites or by homologous recombination. The segment of DNA comprises a polynucleotide that encodes a

polypeptide of interest, and the cassette and restriction sites are designed to ensure insertion of the cassette in the proper reading frame for transcription and translation. "Transformation cassette" refers to a specific vector comprising a polynucleotide that encodes a polypeptide of interest and having elements in addition to the polynucleotide that facilitate transformation of a particular host cell. Cassettes, expression cassettes, gene expression cassettes and transformation cassettes of the invention may also comprise elements that allow for enhanced expression of a polynucleotide encoding a polypeptide of interest in a host cell. These elements may include, but are not limited to: a promoter, a minimal promoter, an enhancer, a response element, a terminator sequence, a polyadenylation sequence, and the like.

For purposes of this invention, the term "gene switch" refers to the combination of a response element associated with a promoter, and an EcR-based gene expression system which, in the presence of one or more ligands, modulates the expression of a gene into which the response element and promoter are incorporated.

The terms "modulate" and "modulates" mean to induce, reduce or inhibit nucleic acid or gene expression, resulting in the respective induction, reduction or inhibition of protein or polypeptide production.

The plasmids or vectors according to the invention may further comprise at least one promoter suitable for driving expression of a gene in a host cell. The term "expression vector" means a vector, plasmid or vehicle designed to enable the expression of an inserted nucleic acid sequence following transformation into the host. The cloned gene, i.e., the inserted nucleic acid sequence, is usually placed under the control of control elements such as a promoter, a minimal promoter, an enhancer, or the like. Initiation control regions or promoters, which are useful to drive expression of a nucleic acid in the desired host cell are numerous and familiar to those skilled in the art. Virtually any promoter capable of driving these genes is suitable for the present invention including but not limited to: viral promoters, bacterial promoters, animal promoters, mammalian promoters, synthetic promoters, constitutive promoters, tissue specific promoter, developmental specific promoters, inducible promoters, light regulated promoters; *CYC1, HIS3, GAL1, GAL4, GAL10, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO, TPI*, alkaline phosphatase promoters (useful for expression in *Saccharomyces*); *AOX1* promoter (useful for expression in *Pichia*); β-lactamase, *lac, ara, tet, trp*, lP_L, lP_R, *T7, tac, and trc* promoters (useful for expression in *Escherichia coli*); light regulated-, seed specific-, pollen specific-, ovary specific-, pathogenesis or disease related-, cauliflower mosaic virus 35S, CMV 35S minimal, cassava vein mosaic virus (CsVMV), chlorophyll a/b binding protein, ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase, shoot-specific, root specific, chitinase, stress inducible, rice tungro bacilliform virus, plant super-promoter, potato leucine aminopeptidase, nitrate reductase, mannopine synthase, nopaline synthase, ubiquitin, zein protein, and anthocyanin promoters (useful for expression in plant cells); animal and mammalian promoters known in the art include, but are not limited to, the SV40 early (SV40e)

promoter region, the promoter contained in the 3' long terminal repeat (LTR) of Rous sarcoma virus (RSV), the promoters of the E1A or major late promoter (MLP) genes of adenoviruses (Ad), the cytomegalovirus (CMV) early promoter, the herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) promoter, a baculovirus IE1 promoter, an elongation factor 1 alpha (EF1) promoter, a phosphoglycerate kinase (PGK) promoter, a ubiquitin (Ubc) promoter, an albumin promoter, the regulatory sequences of the mouse metallothionein-L promoter and transcriptional control regions, the ubiquitous promoters (HPRT, vimentin, α-actin, tubulin and the like), the promoters of the intermediate filaments (desmin, neurofilaments, keratin, GFAP, and the like), the promoters of therapeutic genes (of the MDR, CFTR or factor VIII type, and the like), pathogenesis or disease related-promoters, and promoters that exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals, such as the elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells; insulin gene control region active in pancreatic beta cells, immunoglobulin gene control region active in lymphoid cells, mouse mammary tumor virus control region active in testicular, breast, lymphoid and mast cells; albumin gene, Apo AI and Apo AII control regions active in liver, alpha-fetoprotein gene control region active in liver, alpha 1-antitrypsin gene control region active in the liver, beta-globin gene control region active in myeloid cells, myelin basic protein gene control region active in oligodendrocyte cells in the brain, myosin light chain-2 gene control region active in skeletal muscle, and gonadotropic releasing hormone gene control region active in the hypothalamus, pyruvate kinase promoter, villin promoter, promoter of the fatty acid binding intestinal protein, promoter of the smooth muscle cell α-actin, and the like. In addition, these expression sequences may be modified by addition of enhancer or regulatory sequences and the like.

Enhancers that may be used in embodiments of the invention include but are not limited to: an SV40 enhancer, a cytomegalovirus (CMV) enhancer, an elongation factor 1 (EF1) enhancer, yeast enhancers, viral gene enhancers, and the like.

Termination control regions, *i.e.*, terminator or polyadenylation sequences, may also be derived from various genes native to the preferred hosts. Optionally, a termination site may be unnecessary, however, it is most preferred if included. In a preferred embodiment of the invention, the termination control region may be comprise or be derived from a synthetic sequence, synthetic polyadenylation signal, an SV40 late polyadenylation signal, an SV40 polyadenylation signal, a bovine growth hormone (BGH) polyadenylation signal, viral terminator sequences, or the like.

The terms "3' non-coding sequences" or "3' untranslated region (UTR)" refer to DNA sequences located downstream (3') of a coding sequence and may comprise polyadenylation [poly(A)] recognition sequences and other sequences encoding regulatory signals capable of affecting mRNA processing or gene expression. The polyadenylation signal is usually characterized by affecting the addition of polyadenylic acid tracts to the 3' end of the mRNA precursor.

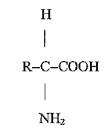
"Regulatory region" means a nucleic acid sequence that regulates the expression of a second nucleic acid sequence. A regulatory region may include sequences which are naturally responsible for

expressing a particular nucleic acid (a homologous region) or may include sequences of a different origin that are responsible for expressing different proteins or even synthetic proteins (a heterologous region). In particular, the sequences can be sequences of prokaryotic, eukaryotic, or viral genes or derived sequences that stimulate or repress transcription of a gene in a specific or non-specific manner and in an inducible or non-inducible manner. Regulatory regions include origins of replication, RNA splice sites, promoters, enhancers, transcriptional termination sequences, and signal sequences which direct the polypeptide into the secretory pathways of the target cell.

A regulatory region from a "heterologous source" is a regulatory region that is not naturally associated with the expressed nucleic acid. Included among the heterologous regulatory regions are regulatory regions from a different species, regulatory regions from a different gene, hybrid regulatory sequences, and regulatory sequences which do not occur in nature, but which are designed by one having ordinary skill in the art.

"RNA transcript" refers to the product resulting from RNA polymerase-catalyzed transcription of a DNA sequence. When the RNA transcript is a perfect complementary copy of the DNA sequence, it is referred to as the primary transcript or it may be a RNA sequence derived from post-transcriptional processing of the primary transcript and is referred to as the mature RNA. "Messenger RNA (mRNA)" refers to the RNA that is without introns and that can be translated into protein by the cell. "cDNA" refers to a double-stranded DNA that is complementary to and derived from mRNA. "Sense" RNA refers to RNA transcript that includes the mRNA and so can be translated into protein by the cell. "Antisense RNA" refers to a RNA transcript that is complementary to all or part of a target primary transcript or mRNA and that blocks the expression of a target gene. The complementarity of an antisense RNA may be with any part of the specific gene transcript, i.e., at the 5' non-coding sequence, 3' non-coding sequence, or the coding sequence. "Functional RNA" refers to antisense RNA, ribozyme RNA, or other RNA that is not translated yet has an effect on cellular processes.

A "polypeptide" is a polymeric compound comprised of covalently linked amino acid residues. Amino acids have the following general structure:



Amino acids are classified into seven groups on the basis of the side chain R: (1) aliphatic side chains, (2) side chains containing a hydroxylic (OH) group, (3) side chains containing sulfur atoms, (4) side chains containing an acidic or amide group, (5) side chains containing a basic group, (6) side chains containing an aromatic ring, and (7) proline, an imino acid in which the side chain is fused to the amino group. A polypeptide of the invention preferably comprises at least about 14 amino acids.

A "protein" is a polypeptide that performs a structural or functional role in a living cell.

An "isolated polypeptide" or "isolated protein" is a polypeptide or protein that is substantially free of those compounds that are normally associated therewith in its natural state (e.g., other proteins or polypeptides, nucleic acids, carbohydrates, lipids). "Isolated" is not meant to exclude artificial or synthetic mixtures with other compounds, or the presence of impurities which do not interfere with biological activity, and which may be present, for example, due to incomplete purification, addition of stabilizers, or compounding into a pharmaceutically acceptable preparation.

A "fragment" of a polypeptide according to the invention will be understood to mean a polypeptide whose amino acid sequence is shorter than that of the reference polypeptide and which comprises, over the entire portion with these reference polypeptides, an identical amino acid sequence. Such fragments may, where appropriate, be included in a larger polypeptide of which they are a part. Such fragments of a polypeptide according to the invention may have a length of at least 2-300 amino acids.

A "heterologous protein" refers to a protein not naturally produced in the cell.

A "mature protein" refers to a post-translationally processed polypeptide; i.e., one from which any pre- or propeptides present in the primary translation product have been removed. "Precursor" protein refers to the primary product of translation of mRNA; i.e., with pre- and propeptides still present. Pre- and propeptides may be but are not limited to intracellular localization signals.

The term "signal peptide" refers to an amino terminal polypeptide preceding the secreted mature protein. The signal peptide is cleaved from and is therefore not present in the mature protein. Signal peptides have the function of directing and translocating secreted proteins across cell membranes. Signal peptide is also referred to as signal protein.

A "signal sequence" is included at the beginning of the coding sequence of a protein to be expressed on the surface of a cell. This sequence encodes a signal peptide, N-terminal to the mature polypeptide, that directs the host cell to translocate the polypeptide. The term "translocation signal sequence" is used herein to refer to this sort of signal sequence. Translocation signal sequences can be found associated with a variety of proteins native to eukaryotes and prokaryotes, and are often functional in both types of organisms.

The term "homology" refers to the percent of identity between two polynucleotide or two polypeptide moieties. The correspondence between the sequence from one moiety to another can be determined by techniques known to the art. For example, homology can be determined by a direct comparison of the sequence information between two polypeptide molecules by aligning the sequence information and using readily available computer programs. Alternatively, homology can be determined by hybridization of polynucleotides under conditions that form stable duplexes between homologous regions, followed by digestion with single-stranded-specific nuclease(s) and size determination of the digested fragments.

As used herein, the term "homologous" in all its grammatical forms and spelling variations refers to the relationship between proteins that possess a "common evolutionary origin," including proteins from superfamilies (*e.g.*, the immunoglobulin superfamily) and homologous proteins from different species (*e.g.*, myosin light chain, etc.) (Reeck et al., 1987, Cell 50: 667.). Such proteins (and their encoding genes) have sequence homology, as reflected by their high degree of sequence similarity. However, in common usage and in the instant application, the term "homologous," when modified with an adverb such as "highly," may refer to sequence similarity and not a common evolutionary origin.

Accordingly, the term "sequence similarity" in all its grammatical forms refers to the degree of identity or correspondence between nucleic acid or amino acid sequences of proteins that may or may not share a common evolutionary origin (*see* Reeck et al., 1987, Cell 50: 667).

In a specific embodiment, two DNA sequences are "substantially homologous" or "substantially similar" when at least about 50% (preferably at least about 75%, and most preferably at least about 90 or 95%) of the nucleotides match over the defined length of the DNA sequences. Sequences that are substantially homologous can be identified by comparing the sequences using standard software available in sequence data banks, or in a Southern hybridization experiment under, for example, stringent conditions as defined for that particular system. Defining appropriate hybridization conditions is within the skill of the art. See, e.g., Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

As used herein, "substantially similar" refers to nucleic acid fragments wherein changes in one or more nucleotide bases results in substitution of one or more amino acids, but do not affect the functional properties of the protein encoded by the DNA sequence. "Substantially similar" also refers to nucleic acid fragments wherein changes in one or more nucleotide bases does not affect the ability of the nucleic acid fragment to mediate alteration of gene expression by antisense or co-suppression technology. "Substantially similar" also refers to modifications of the nucleic acid fragments of the instant invention such as deletion or insertion of one or more nucleotide bases that do not substantially affect the functional properties of the resulting transcript. It is therefore understood that the invention encompasses more than the specific exemplary sequences. Each of the proposed modifications is well within the routine skill in the art, as is determination of retention of biological activity of the encoded products.

Moreover, the skilled artisan recognizes that substantially similar sequences encompassed by this invention are also defined by their ability to hybridize, under stringent conditions (0.1X SSC, 0.1% SDS, 65°C and washed with 2X SSC, 0.1% SDS followed by 0.1X SSC, 0.1% SDS), with the sequences exemplified herein. Substantially similar nucleic acid fragments of the instant invention are those nucleic acid fragments whose DNA sequences are at least 70% identical to the DNA sequence of the nucleic acid fragments reported herein. Preferred substantially nucleic acid fragments of the instant invention are those nucleic acid fragments whose DNA sequences are at least 80% identical to the DNA sequence of the nucleic acid fragments reported herein. More preferred nucleic acid fragments are at

least 90% identical to the DNA sequence of the nucleic acid fragments reported herein. Even more preferred are nucleic acid fragments that are at least 95% identical to the DNA sequence of the nucleic acid fragments reported herein.

Two amino acid sequences are "substantially homologous" or "substantially similar" when greater than about 40% of the amino acids are identical, or greater than 60% are similar (functionally identical). Preferably, the similar or homologous sequences are identified by alignment using, for example, the GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, *Version 7*, Madison, Wisconsin) pileup program.

The term "corresponding to" is used herein to refer to similar or homologous sequences, whether the exact position is identical or different from the molecule to which the similarity or homology is measured. A nucleic acid or amino acid sequence alignment may include spaces. Thus, the term "corresponding to" refers to the sequence similarity, and not the numbering of the amino acid residues or nucleotide bases.

A "substantial portion" of an amino acid or nucleotide sequence comprises enough of the amino acid sequence of a polypeptide or the nucleotide sequence of a gene to putatively identify that polypeptide or gene, either by manual evaluation of the sequence by one skilled in the art, or by computer-automated sequence comparison and identification using algorithms such as BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S. F., et al., (1993) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410; see also www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). In general, a sequence of ten or more contiguous amino acids or thirty or more nucleotides is necessary in order to putatively identify a polypeptide or nucleic acid sequence as homologous to a known protein or gene. Moreover, with respect to nucleotide sequences, gene specific oligonucleotide probes comprising 20-30 contiguous nucleotides may be used in sequence-dependent methods of gene identification (e.g., Southern hybridization) and isolation (e.g., *in situ* hybridization of bacterial colonies or bacteriophage plaques). In addition, short oligonucleotides of 12-15 bases may be used as amplification primers in PCR in order to obtain a particular nucleic acid fragment comprising the primers. Accordingly, a "substantial portion" of a nucleotide sequence comprises enough of the sequence to specifically identify and/or isolate a nucleic acid fragment comprising the sequence.

The term "percent identity", as known in the art, is a relationship between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between polypeptide or polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by the match between strings of such sequences. "Identity" and "similarity" can be readily calculated by known methods, including but not limited to those described in: *Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, New York (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (Smith, D. W., ed.) Academic Press, New York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I* (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, New Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology* (von

Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); and *Sequence Analysis Primer* (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.) Stockton Press, New York (1991). Preferred methods to determine identity are designed to give the best match between the sequences tested. Methods to determine identity and similarity are codified in publicly available computer programs. Sequence alignments and percent identity calculations may be performed using the Megalign program of the LASERGENE bioinformatics computing suite (DNASTAR Inc., Madison, WI). Multiple alignment of the sequences may be performed using the Clustal method of alignment (Higgins and Sharp (1989) *CABIOS.* 5:151-153) with the default parameters (GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=10). Default parameters for pairwise alignments using the Clustal method may be selected: KTUPLE 1, GAP PENALTY=3, WINDOW=5 and DIAGONALS SAVED=5.

The term "sequence analysis software" refers to any computer algorithm or software program that is useful for the analysis of nucleotide or amino acid sequences. "Sequence analysis software" may be commercially available or independently developed. Typical sequence analysis software will include but is not limited to the GCG suite of programs (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI), BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), and DNASTAR (DNASTAR, Inc. 1228 S. Park St. Madison, WI 53715 USA). Within the context of this application it will be understood that where sequence analysis software is used for analysis, that the results of the analysis will be based on the "default values" of the program referenced, unless otherwise specified. As used herein "default values" will mean any set of values or parameters which originally load with the software when first initialized.

"Synthetic genes" can be assembled from oligonucleotide building blocks that are chemically synthesized using procedures known to those skilled in the art. These building blocks are ligated and annealed to form gene segments that are then enzymatically assembled to construct the entire gene. "Chemically synthesized", as related to a sequence of DNA, means that the component nucleotides were assembled *in vitro*. Manual chemical synthesis of DNA may be accomplished using well-established procedures, or automated chemical synthesis can be performed using one of a number of commercially available machines. Accordingly, the genes can be tailored for optimal gene expression based on optimization of nucleotide sequence to reflect the codon bias of the host cell. The skilled artisan appreciates the likelihood of successful gene expression if codon usage is biased towards those codons favored by the host. Determination of preferred codons can be based on a survey of genes derived from the host cell where sequence information is available.

Polynucleotides Encoding Whitefly Ecdysone Receptor Polypeptides

The present invention provides novel polynucleotides encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide of the invention, including a full-length whitefly ecdysone receptor protein, and any whitefly ecdysone receptor-specific fragments thereof.

In accordance with specific embodiments of the present invention, nucleic acid sequences encoding portions of a novel ecdysone receptor polypeptide have been elucidated and characterized. Specifically, polynucleotides encoding a homopteran ecdysone receptor from whitefly (BaEcR) has been characterized. The full-length encoding sequence has been determined and is presented herein as nucleotides 102-1349 of SEQ ID NO: 1. In addition, domains within this polynucleotide encoding the full-length BaEcR polypeptide have been defined and are presented herein as described in Table 1.

Table 1. Nucleotide and amino acid sequences corresponding to various domains and helices of whitefly ecdysone receptor ("BaEcR").

Full Length BaEcR or BaEcR Domains	Nucleotides of SEQ ID NO: 1	Amino Acids of SEQ ID NO: 2
A/BCDE (Full length)	102-1349	1-416
A/B	102-258	1-52
C	259-457	53-118
D	458-677	119-192
E	678-1349	193-416
CDE	259-1349	53-416
DE	458-1349	119-416
Helices 1-12	648-1349	183-416

Thus, a first subject of the invention relates to an isolated polynucleotide encoding a novel ecdysone receptor polypeptide. More specifically, the invention relates to an isolated polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide. In a specific embodiment, the isolated polynucleotide comprises a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, nucleotides 102-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 102-258 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 259-457 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 458-677 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 678-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 259-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 458-1349 of SEQ ID NO: 1, and nucleotides 648-1349 of SEQ ID NO: 1. In another specific embodiment, the isolated polynucleotide comprises a nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 1. In another specific embodiment, the isolated polynucleotide comprises a nucleic acid sequence as depicted in nucleotides 102-1349 of SEQ ID NO: 1. In another specific embodiment, the isolated polynucleotide further comprises a region permitting expression of the polypeptide in a host cell.

The present invention also relates to an isolated polynucleotide encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, amino acids 1-52 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-118 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-192 of SEQ ID NO: 2, amino acids 193-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-416 of SEQ ID NO: 2, and amino acids 183-416 of SEQ ID NO: 2. In a specific embodiment, the isolated polynucleotide encodes a whitefly ecdysone receptor polypeptide comprising an amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 2.

The present invention provides novel isolated polynucleotides encoding whitefly ecdysone receptor polypeptides. Having elucidated the sequence and structure of this ecdysone receptor, an isolated polynucleotide encoding a whitefly receptor polypeptide comprising a ligand-binding domain may be used individually or in combination to screen for new ligands that bind this ligand binding domain. Thus, for example, an ecdysone receptor polypeptide according to the invention may be used to control expression of reporter genes for which sensitive assays exist. The ligand binding domain may serve as a reagent for screening new molecules, useful as either agonists or antagonists of the whitefly ecdysone receptor. Either new classes of molecules may be screened, or selected modifications from known ligands may be used. These new ligands find use as highly specific and highly active, naturally occurring pesticides. Thus, the present invention provides for screening for new ligand molecules.

The polynucleotides of the present invention also provide probes for screening for homologous nucleic acid sequences, both in *Bamecia* and other genetic sources. This screening allows isolation of homologous genes from both vertebrates and invertebrates.

Accordingly, any whitefly cell potentially can serve as the nucleic acid source for the molecular cloning of a whitefly ecdysone receptor polynucleotide. The polynucleotide may be obtained by standard procedures known in the art from cloned DNA (*e.g.*, a DNA "library"), and preferably is obtained from a cDNA library prepared from tissues with high level expression of the protein, by chemical synthesis, by cDNA cloning, or by the cloning of genomic DNA, or fragments thereof, purified from the desired cell (See, for example, Sambrook et al., 1989, *supra*; Glover, D.M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II). Clones derived from genomic DNA may contain regulatory and intron DNA regions in addition to coding regions; clones derived from cDNA will not contain intron sequences. Whatever the source, the polynucleotide should be molecularly cloned into a suitable vector for propagation of the polynucleotide.

Once the DNA fragments are generated, identification of the specific DNA fragment containing the desired whitefly ecdysone receptor polynucleotide may be accomplished in a number of ways. For example, DNA fragments may be screened by nucleic acid hybridization to a labeled probe (Benton and Davis, 1977, Science 196: 180; Grunstein and Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3961). Those DNA fragments with substantial homology to the probe will hybridize. As noted above, the greater the degree of homology, the more stringent hybridization conditions can be used.

Further selection can be carried out on the basis of the properties of the polynucleotide, *e.g.*, if the polynucleotide encodes a polypeptide having the isoelectric, electrophoretic, amino acid composition, or partial amino acid sequence of the whitefly ecdysone receptor polypeptide as disclosed herein. Thus, the presence of the polynucleotide may be detected by assays based on the physical, chemical, or immunological properties of its expressed product. For example, cDNA clones, or DNA clones which hybrid-select the proper mRNAs, can be selected which produce a polypeptide that, *e.g.*, has similar or identical electrophoretic migration, isoelectric focusing or non-equilibrium pH gel electrophoresis

behavior, proteolytic digestion maps, or antigenic properties as known for a whitefly ecdysone receptor polypeptide. In a specific embodiment, the expressed polypeptide is recognized by a polyclonal antibody that is generated against an epitope specific for a whitefly ecdysone receptor polypeptide.

Due to the degeneracy of nucleotide coding sequences, other polynucleotides that encode substantially the same amino acid sequence as a whitefly ecdysone receptor polynucleotide disclosed herein, including an amino acid sequence that contains a single amino acid variant, may be used in the practice of the present invention. These include but are not limited to allelic genes, homologous genes from other species, and nucleotide sequences comprising all or portions of whitefly ecdysone receptor polynucleotides that are altered by the substitution of different codons that encode the same amino acid residue within the sequence, thus producing a silent change. Likewise, the whitefly ecdysone receptor derivatives of the invention include, but are not limited to, those comprising, as a primary amino acid sequence, all or part of the amino acid sequence of a whitefly ecdysone receptor polypeptide including altered sequences in which functionally equivalent amino acid residues are substituted for residues within the sequence resulting in a conservative amino acid substitution. For example, one or more amino acid residues within the sequence can be substituted by another amino acid of a similar polarity, which acts as a functional equivalent, resulting in a silent alteration. Substitutes for an amino acid within the sequence may be selected from other members of the class to which the amino acid belongs. For example, the nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan and methionine. Amino acids containing aromatic ring structures are phenylalanine, tryptophan, and tyrosine. The polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid. Such alterations can be produced by various methods known in the art (see Sambrook et al., 1989, *infra*) and are not expected to affect apparent molecular weight as determined by polyacrylamide gel electrophoresis, or isoelectric point.

The present invention also relates to an isolated whitefly ecdysone receptor polypeptide encoded by a polynucleotide according to the invention.

Whitefly Ecdysone Receptor Polypeptides

The present invention provides novel isolated whitefly ecdysone receptor polypeptides, including a full-length whitefly ecdysone receptor protein, and any whitefly ecdysone receptor-specific polypeptide fragments thereof.

Thus, the invention relates to an isolated ecdysone receptor polypeptide. More specifically, the invention relates to an isolated whitefly ecdysone receptor polypeptide. In a specific embodiment, the isolated ecdysone receptor polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, amino acids 1-52 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-118 of SEQ ID NO: 2,

amino acids 119-192 of SEQ ID NO: 2, amino acids 193-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-416 of SEQ ID NO: 2, and amino acids 183-416 of SEQ ID NO: 2. In another specific embodiment, the isolated ecdysone receptor polypeptide comprises an amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 2.

In another specific embodiment, the isolated ecdysone receptor polypeptide is encoded by a polynucleotide comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, nucleotides 102-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 102-258 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 259-457 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 458-677 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 678-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 259-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 458-1349 of SEQ ID NO: 1, and nucleotides 648-1349 of SEQ ID NO: 1. In another specific embodiment, the isolated ecdysone receptor polypeptide is encoded by a polynucleotide comprising a nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 1. In another specific embodiment, the isolated ecdysone receptor polypeptide is encoded by a polynucleotide comprising a nucleic acid sequence as depicted in nucleotides 102-1349 of SEQ ID NO: 1.

One of skill in the art is able to produce other polynucleotides to encode the polypeptides of the invention, by making use of the present invention and the degeneracy or non-universality of the genetic code as described herein.

Additional embodiments of the present invention include an ecdysone receptor polypeptide according to the invention, wherein the ecdysone receptor polypeptide is substantially free of naturally associated cell components. Such polypeptides will typically be either full-length proteins, functional fragments, or fusion proteins comprising segments from an ecdysone receptor polypeptide of the present invention fused to a heterologous, or normally non-contiguous, protein domain. Preferably, the ecdysone receptor polypeptide comprises a transactivation domain, a DNA binding domain, a ligand binding domain, a hinge region, or a heterodimerization domain. More preferably, the ecdysone receptor polypeptide comprises a ligand binding domain that is capable of binding to a ligand selected from the group consisting of a steroid ligand and a non-steroid ligand. As desired, the ecdysone receptor polypeptide may be fused to a second polypeptide to generate a hybrid polypeptide. Preferably, the second polypeptide is a heterologous polypeptide from the steroid hormone nuclear receptor superfamily.

Besides substantially full-length polypeptides, the present invention provides for biologically active fragments of the polypeptides. Significant biological activities include transactivation activity, ligand binding, DNA binding, heterodimerization activity, immunological activity and other biological activities characteristic of steroid receptor superfamily members. Immunological activities include both immunogenic function in a target immune system, as well as sharing of immunological epitopes for binding, serving as either a competitor or substitute antigen for an ecdysone receptor epitope.

For example, transactivation, ligand binding, or DNA-binding domains may be "swapped" between different new fusion polypeptides or fragments. Thus, novel hybrid polypeptides exhibiting new combinations of specificities result from the functional linkage of transactivation, ligand-binding

specificities, or DNA-binding domains. This is extremely useful in the design of inducible expression systems.

For immunological purposes, immunogens may be produced that tandemly repeat polypeptide segments, thereby producing highly antigenic proteins. Alternatively, such polypeptides will serve as highly efficient competitors for specific binding. Production of antibodies to BaEcR is described below.

The present invention also provides for other polypeptides comprising fragments of BaEcR. Thus, fusion polypeptides between the BaEcR segments and other homologous or heterologous proteins are provided. Homologous polypeptides may be fusions between different steroid receptor superfamily members, resulting in, for instance, a hybrid protein exhibiting ligand specificity of one member and DNA-binding specificity of another. Likewise, heterologous fusions may be constructed which would exhibit a combination of properties or activities of the derivative proteins. Typical examples are fusions of a reporter polypeptide, e.g., luciferase, with another domain of a receptor, e.g., a DNA-binding domain, so that the presence or location of a desired ligand may be easily determined. See, e.g., Dull et al., U.S. Pat. No. 4,859,609, which is hereby incorporated herein by reference. Other typical gene fusion partners include "zinc finger" segment swapping between DNA-binding proteins, bacterial beta-galactosidase, trpE Protein A, beta-lactamase, alpha amylase, alcohol dehydrogenase and yeast alpha mating factor. See, e.g., Godowski et al. (1988), Science 241: 812-816.

Thus, the present invention also provides an isolated polypeptide selected from the group consisting of a) an isolated polypeptide comprising a transactivation domain, a DNA-binding domain, and a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain; b) an isolated polypeptide comprising a DNA-binding domain and a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain; and c) an isolated polypeptide comprising a transactivation domain and a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain. Preferably, the whitefly ecdysone receptor ligand binding domain comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, amino acids 193-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-416 of SEQ ID NO: 2, and amino acids 183-416 of SEQ ID NO: 2. In another preferred embodiment, the whitefly ecdysone receptor ligand binding domain is encoded by a polynucleotide comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, nucleotides 102-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 678-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 259-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 458-1349 of SEQ ID NO: 1, and nucleotides 648-1349 of SEQ ID NO: 1.

The present invention also provides an isolated hybrid polypeptide selected from the group consisting of a) an isolated hybrid polypeptide comprising a transactivation domain, a DNA-binding domain, and a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain; b) an isolated hybrid polypeptide comprising a DNA-binding domain and a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain; and c) an isolated hybrid polypeptide comprising a transactivation domain and a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain. Preferably, the whitefly ecdysone receptor ligand binding domain comprises an amino

acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, amino acids 193-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-416 of SEQ ID NO: 2, and amino acids 183-416 of SEQ ID NO: 2. In another preferred embodiment, the whitefly ecdysone receptor ligand binding domain is encoded by a polynucleotide comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, nucleotides 102-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 678-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 259-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 458-1349 of SEQ ID NO: 1, and nucleotides 648-1349 of SEQ ID NO: 1.

The present invention also relates to compositions comprising an isolated polypeptide according to the invention.

Compositions

The present invention also relates to compositions comprising the isolated polynucleotides or polypeptides according to the invention. Such compositions may comprise a whitefly ecdysone receptor polypeptide or a polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide, as defined above, and an acceptable carrier or vehicle. The compositions of the invention are particularly suitable for formulation of biological material for use in a gene expression modulation system or a ligand-screening assay according to the invention. Thus, in a preferred embodiment, the composition comprises a polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide. In another preferred embodiment, the composition comprises a whitefly ecdysone receptor polypeptide according to the invention.

The phrase "acceptable" refers to molecular entities and compositions that are physiologically tolerable to the cell or organism when administered. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the composition is administered. Such carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Examples of acceptable carriers are saline, buffered saline, isotonic saline (e.g., monosodium or disodium phosphate, sodium, potassium, calcium or magnesium chloride, or mixtures of such salts), Ringer's solution, dextrose, water, sterile water, glycerol, ethanol, and combinations thereof. 1,3-butanediol and sterile fixed oils are conveniently employed as solvents or suspending media. Any bland fixed oil can be employed including synthetic mono- or di-glycerides. Fatty acids such as oleic acid also find use in the preparation of injectables. Water or aqueous solution saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions are preferably employed as carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin. Pharmaceutical compositions of the invention may be formulated for the purpose of topical, oral, parenteral, intranasal, intravenous, intramuscular, subcutaneous, intraocular, and the like, administration.

Preferably, the compositions comprise an acceptable vehicle for an injectable formulation. This vehicle can be, in particular, a sterile, isotonic saline solution (monosodium or disodium phosphate,

sodium, potassium, calcium or magnesium chloride, and the like, or mixtures of such salts), or dry, in particular lyophilized, compositions which, on addition, as appropriate, of sterilized water or of physiological saline, enable injectable solutions to be formed. The preferred sterile injectable preparations can be a solution or suspension in a nontoxic parenterally acceptable solvent or diluent.

In yet another embodiment, a composition comprising a whitefly ecdysone receptor polypeptide, or polynucleotide encoding the polypeptide, can be delivered in a controlled release system. For example, the polynucleotide or polypeptide may be administered using intravenous infusion, an implantable osmotic pump, a transdermal patch, liposomes, or other modes of administration. Other controlled release systems are discussed in a review by Langer [*Science* 249: 1527-1533 (1990)].

Expression of Whitefly Ecdysone Receptor Polypeptides

With the sequence of the receptor polypeptides and the polynucleotides encoding them, large quantities of whitefly ecdysone receptor polypeptides may be prepared. By the appropriate expression of vectors in cells, high efficiency production may be achieved. Thereafter, standard purification methods may be used, such as ammonium sulfate precipitations, column chromatography, electrophoresis, centrifugation, crystallization and others. See various volumes of Methods in Enzymology for techniques typically used for protein purification. Alternatively, in some embodiments high efficiency of production is unnecessary, but the presence of a known inducing protein within a carefully engineered expression system is quite valuable. For instance, a combination of: (1) a ligand-responsive enhancer or response element operably linked to (2) a desired gene sequence with (3) the corresponding whitefly ecdysone receptor polypeptide together in an expression system provides a specifically inducible expression system. Typically, the expression system will be a cell, but an *in vitro* expression system may also be constructed.

A polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor, or fragment, derivative or analog thereof, or a functionally active derivative, including a chimeric protein, thereof, can be inserted into an appropriate expression vector, *i.e.*, a vector which comprises the necessary elements for the transcription and translation of the inserted protein-coding sequence. Thus, the polynucleotide of the invention is operationally linked with a transcriptional control sequence in an expression vector of the invention. Both cDNA and genomic sequences can be cloned and expressed under control of such regulatory sequences. An expression vector also preferably includes a replication origin.

The isolated polynucleotides of the invention may be inserted into any appropriate cloning vector. A large number of vector-host systems known in the art may be used. Possible vectors include, but are not limited to, plasmids or modified viruses, but the vector system must be compatible with the host cell used. Examples of vectors include, but are not limited to, *Escherichia coli*, bacteriophages such as lambda derivatives, or plasmids such as pBR322 derivatives or pUC plasmid derivatives, *e.g.*, pGEX

vectors, pmal-c, pFLAG, etc. The insertion into a cloning vector can, for example, be accomplished by ligating the polynucleotide into a cloning vector that has complementary cohesive termini. However, if the complementary restriction sites used to fragment the polynucleotide are not present in the cloning vector, the ends of the polynucleotide molecules may be enzymatically modified. Alternatively, any site desired may be produced by ligating nucleotide sequences (linkers) onto the DNA termini; these ligated linkers may comprise specific chemically synthesized oligonucleotides encoding restriction endonuclease recognition sequences. Preferably, the cloned gene is contained on a shuttle vector plasmid, which provides for expansion in a cloning cell, *e.g.*, *E. coli*, and purification for subsequent insertion into an appropriate expression cell line, if such is desired. For example, a shuttle vector, which is a vector that can replicate in more than one type of organism, can be prepared for replication in both *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by linking sequences from an *E. coli* plasmid with sequences form the yeast 2μ plasmid.

In addition, the present invention relates to an expression vector comprising a polynucleotide according the invention, operatively linked to a transcription regulatory element. Preferably, the polynucleotide is operatively linked with an expression control sequence permitting expression of the nuclear receptor ligand binding domain in an expression competent host cell. The expression control sequence may comprise a promoter that is functional in the host cell in which expression is desired. The vector may be a plasmid DNA molecule or a viral vector. Preferred viral vectors include retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus, herpes virus, and vaccinia virus. The invention further relates to a replication defective recombinant virus comprising in its genome, a polynucleotide according to the invention. Thus, the present invention also relates to an isolated host cell comprising such an expression vector, wherein the transcription regulatory element is operative in the host cell.

The desired genes will be inserted into any of a wide selection of expression vectors. The selection of an appropriate vector and cell line depends upon the constraints of the desired product. Typical expression vectors are described in Sambrook et al. (1989). Suitable cell lines may be selected from a depository, such as the ATCC. See, ATCC Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (6th ed.) (1988); ATCC Cell Lines, Viruses, and Antisera, each of which is hereby incorporated herein by reference. The vectors are introduced to the desired cells by standard transformation or transfection procedures as described, for instance, in Sambrook et al. (1989).

Fusion proteins will typically be made by either recombinant nucleic acid methods or by synthetic polypeptide methods. Techniques for nucleic acid manipulation are described generally, for example, in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, which are incorporated herein by reference. Techniques for synthesis of polypeptides are described, for example, in Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-2156 (1963).

The nucleotide sequences used to produce fusion proteins of the present invention may be derived from natural or synthetic sequences. Many natural gene sequences are obtainable from various

cDNA or from genomic libraries using appropriate probes. See, GenBank™, National Institutes of Health. Typical probes for whitefly ecdysone receptors may be selected from the sequences of Table 1 in accordance with standard procedures. Suitable synthetic DNA fragments may be prepared by the phosphoramidite method described by Beaucage and Carruthers, Tetra. Letts. 22: 1859-1862 (1981). A double stranded fragment may then be obtained either by synthesizing the complementary strand and annealing the strand together under appropriate conditions or by adding the complementary strand using DNA polymerase with an appropriate primer sequence.

The natural or synthetic polynucleotide fragments encoding a desired whitefly ecdysone receptor polypeptide fragment will be incorporated into nucleic acid constructs capable of introduction to and expression in an *in vitro* cell culture. Usually the nucleic acid constructs will be suitable for replication in a unicellular host, such as yeast or bacteria, but may also be intended for introduction to, with and without and integration within the genome, cultured mammalian or plant or other eukaryotic cell lines. Nucleic acid constructs prepared for introduction into bacteria or yeast will typically include a replication system recognized by the host, the intended DNA fragment encoding the desired receptor polypeptide, transcription and translational initiation regulatory sequences operably linked to the polypeptide encoding segment and transcriptional and translational termination regulatory sequences operably linked to the polypeptide encoding segment. The transcriptional regulatory sequences will typically include a heterologous enhancer, response element, or promoter which is recognized by the host. The selection of an appropriate promoter will depend upon the host, but promoters such as the trp, lac and phage promoters, tRNA promoters and glycolytic enzyme promoters are known. See, Sambrook et al. (1989). Conveniently available expression vectors which include the replication system and transcriptional and translational regulatory sequences together with the insertion site for the steroid receptor DNA sequence may be employed. Examples of workable combinations of cell lines and expression vectors are described in Sambrook et al. (1989); see also, Metzger et al. (1988), Nature 334: 31-36.

Once a particular recombinant DNA molecule is identified and isolated, several methods known in the art may be used to propagate it. Once a suitable host system and growth conditions are established, recombinant expression vectors can be propagated and prepared in quantity. As previously explained, the expression vectors which can be used include, but are not limited to, the following vectors or their derivatives: human or animal viruses such as vaccinia virus or adenovirus; insect viruses such as baculovirus; yeast vectors; bacteriophage vectors (*e.g.*, lambda), and plasmid and cosmid DNA vectors, to name but a few.

In addition, a host cell strain may be chosen which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the translational and post-translational processing and modification of proteins. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the desired

modification and processing of the foreign protein expressed. Expression in yeast can produce a biologically active product. Expression in eukaryotic cells can increase the likelihood of "native" folding. Moreover, expression in mammalian cells can provide a tool for reconstituting, or constituting, whitefly ecdysone receptor activity. Furthermore, different vector/host expression systems may affect processing reactions, such as proteolytic cleavages, to a different extent.

Vectors are introduced into the desired host cells by methods known in the art, *e.g.*, transfection, electroporation, microinjection, transduction, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, lipofection (lysosome fusion), particle bombardment, use of a gene gun, or a DNA vector transporter (see, *e.g.*, Wu et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:963-967; Wu and Wu, 1988, J. Biol. Chem. 263:14621-14624; Hartmut et al., Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed March 15, 1990).

Soluble forms of the protein can be obtained by collecting culture fluid, or solubilizing inclusion bodies, *e.g.*, by treatment with detergent, and if desired sonication or other mechanical processes, as described above. The solubilized or soluble protein can be isolated using various techniques, such as polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), isoelectric focusing, 2-dimensional gel electrophoresis, chromatography (*e.g.*, ion exchange, affinity, immunoaffinity, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, immunoprecipitation, or by any other standard technique for the purification of proteins.

Vectors and Gene Expression Cassettes Comprising a Whitefly Ecdysone Receptor Polynucleotide

Thus, the present invention also relates to a vector comprising a polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide according to the invention. The present invention also provides a gene expression cassette comprising a polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide according to the invention. The polynucleotides of the invention, where appropriate incorporated in vectors or gene expression cassettes, and the compositions comprising them, are useful for regulating gene expression in an ecdysone receptor-based gene expression system. They may be used for the transfer and expression of genes *in vitro* or *in vivo* in any type of cell or tissue. The transformation can, moreover, be targeted (transfer to a particular tissue can, in particular, be determined by the choice of a vector, and expression by the choice of a particular promoter). The polynucleotides and vectors of the invention are advantageously used for the production *in vivo* and intracellularly, of polypeptides of interest.

The polynucleotides encoding the whitefly ecdysone receptor polypeptides of the invention will typically be used in a plasmid vector. Preferably, an expression control sequence is operably linked to the whitefly ecdysone receptor polynucleotide coding sequence for expression of the whitefly ecdysone receptor polypeptide. The expression control sequence may be any enhancer, response element, or promoter system in vectors capable of transforming or transfecting a host cell. Once the vector has been incorporated into the appropriate host, the host, depending on the use, will be maintained under

conditions suitable for high-level expression of the polynucleotides.

Polynucleotides will normally be expressed in hosts after the sequences have been operably linked to (i.e., positioned to ensure the functioning of) an expression control sequence. These expression vectors are typically replicable in the host organisms either as episomes or as an integral part of the host chromosomal DNA. Commonly, expression vectors will contain selection markers, e.g., tetracycline or neomycin, to permit detection of those cells transformed with the desired DNA sequences (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,704,362, which is incorporated herein by reference).

Escherichia coli is one prokaryotic host useful for cloning the polynucleotides of the present invention. Other microbial hosts suitable for use include bacilli, such as *Bacillus subtilis*, and other enterobacteriaceae, such as *Salmonella*, *Serratia*, and various *Pseudomonas* species.

Other eukaryotic cells may be used, including yeast cells, insect tissue culture cells, avian cells or the like. Preferably, mammalian tissue cell culture will be used to produce the polypeptides of the present invention (see, Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y. (1987), which is incorporated herein by reference). Yeast and mammalian cells are preferred cells in which to use whitefly ecdysone receptor-based inducible gene expression systems because they naturally lack the molecules which confer responsiveness to the ligands for ecdysone receptor.

Expression vectors may also include expression control sequences, such as an origin of replication, a promoter, an enhancer, a response element, and necessary processing information sites, such as ribosome-binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites, and transcriptional terminator sequences. Preferably, the enhancers or promoters will be those naturally associated with genes encoding the steroid receptors, although it will be understood that in many cases others will be equally or more appropriate. Other preferred expression control sequences are enhancers or promoters derived from viruses, such as SV40, Adenovirus, Bovine Papilloma Virus, and the like.

The vectors comprising the polynucleotides of the present invention can be transferred into the host cell by well-known methods, which vary depending on the type of cellular host. For example, calcium chloride transfection is commonly utilized for procaryotic cells, whereas calcium phosphate treatment may be used for other cellular hosts. (See, generally, Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.), Cold Spring Harbor Press, which is incorporated herein by reference.) The term "transformed cell" is meant to also include the progeny of a transformed cell.

The necessary transcriptional and translational signals can be provided on a recombinant expression vector, or they may be supplied by the native gene encoding whitefly ecdysone receptor and/or its flanking regions. Potential host-vector systems include but are not limited to mammalian cell systems infected with virus (*e.g.*, vaccinia virus, adenovirus, etc.); insect cell systems infected with virus (*e.g.*, baculovirus); microorganisms such as yeast containing yeast vectors; or bacteria transformed with bacteriophage, DNA, plasmid DNA, or cosmid DNA. The expression elements of vectors vary in their strengths and specificities. Depending on the host-vector system utilized, any one of a number of

suitable transcription and translation elements may be used.

A recombinant whitefly ecdysone receptor protein of the invention, or functional fragment, derivative, chimeric construct, or analog thereof, may be expressed chromosomally, after integration of the coding sequence by recombination. In this regard, any of a number of amplification systems may be used to achieve high levels of stable gene expression (*See* Sambrook et al., 1989, *supra*).

The cell into which the recombinant vector comprising the polynucleotide encoding whitefly ecdysone receptor is cultured in an appropriate cell culture medium under conditions that provide for expression of whitefly ecdysone receptor by the cell. Any of the methods previously described for the insertion of DNA fragments into a cloning vector may be used to construct expression vectors containing a gene consisting of appropriate transcriptional/translational control signals and the protein coding sequences. These methods may include *in vitro* recombinant DNA and synthetic techniques and *in vivo* recombination (genetic recombination).

A polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide may be operably linked and controlled by any regulatory region, *i.e.*, promoter/enhancer element known in the art, but these regulatory elements must be functional in the host cell selected for expression. The regulatory regions may comprise a promoter region for functional transcription in the host cell, as well as a region situated 3' of the gene of interest, and which specifies a signal for termination of transcription and a polyadenylation site. All these elements constitute an expression cassette.

Expression vectors comprising a polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide of the invention can be identified by five general approaches: (a) PCR amplification of the desired plasmid DNA or specific mRNA, (b) nucleic acid hybridization, (c) presence or absence of selection marker gene functions, (d) analyses with appropriate restriction endonucleases, and (e) expression of inserted sequences. In the first approach, the nucleic acids can be amplified by PCR to provide for detection of the amplified product. In the second approach, the presence of a foreign gene inserted in an expression vector can be detected by nucleic acid hybridization using probes comprising sequences that are homologous to an inserted marker gene. In the third approach, the recombinant vector/host system can be identified and selected based upon the presence or absence of certain "selection marker" gene functions (*e.g.*, β-galactosidase activity, thymidine kinase activity, resistance to antibiotics, transformation phenotype, occlusion body formation in baculovirus, etc.) caused by the insertion of foreign genes in the vector. In another example, if the nucleic acid encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide is inserted within the "selection marker" gene sequence of the vector, recombinants comprising the whitefly ecdysone receptor nucleic acid insert can be identified by the absence of the gene function. In the fourth approach, recombinant expression vectors are identified by digestion with appropriate restriction enzymes. In the fifth approach, recombinant expression vectors can be identified by assaying for the activity, biochemical, or immunological characteristics of the gene product expressed by the recombinant, provided that the expressed protein assumes a functionally active

conformation.

A wide variety of host/expression vector combinations may be employed in expressing the DNA sequences of this invention. Useful expression vectors, for example, may consist of segments of chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences. Suitable vectors include but are not limited to derivatives of SV40 and known bacterial plasmids, *e.g., E. coli* plasmids col El, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX (Smith *et al.*, 1988, Gene 67: 31-40), pMB9 and their derivatives, plasmids such as RP4; phage DNAS, e.g., the numerous derivatives of phage l, e.g., NM989, and other phage DNA, *e.g.*, M13 and filamentous single stranded phage DNA; yeast plasmids such as the 2m plasmid or derivatives thereof; vectors useful in eukaryotic cells, such as vectors useful in insect or mammalian cells; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNAs, such as plasmids that have been modified to employ phage DNA or other expression control sequences; and the like.

The present invention also provides a gene expression cassette that is capable of being expressed in a host cell, wherein the gene expression cassette comprises a polynucleotide that encodes a whitefly ecdysone receptor polypeptide according to the invention. Thus, Applicants' invention also provides novel gene expression cassettes useful in an ecdysone receptor-based gene expression system.

In a specific embodiment, the gene expression cassette that is capable of being expressed in a host cell comprises a polynucleotide that encodes a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising a transactivation domain, a DNA-binding domain, and a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain; b) a polypeptide comprising a DNA-binding domain and a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain; and c) a polypeptide comprising a transactivation domain and a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain.

In another specific embodiment, the present invention provides a gene expression cassette that is capable of being expressed in a host cell, wherein the gene expression cassette comprises a polynucleotide that encodes a hybrid polypeptide selected from the group consisting of a) a hybrid polypeptide comprising a transactivation domain, a DNA-binding domain, and a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain; b) a hybrid polypeptide comprising a DNA-binding domain and a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain; and c) a hybrid polypeptide comprising a transactivation domain and a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain. A hybrid polypeptide according to the invention comprises at least two polypeptide fragments, wherein each polypeptide fragment is from a different source, i.e., a different polypeptide, a different nuclear receptor, a different species, *etc.* The hybrid polypeptide according to the invention may comprise at least two polypeptide domains, wherein each polypeptide domain is from a different source.

Preferably, the whitefly ecdysone receptor ligand binding domain is from a whitefly *Bamecia argentifoli* EcR ("BaEcR").

In a specific embodiment, the whitefly ecdysone receptor ligand binding domain is encoded by a polynucleotide comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1,

nucleotides 102-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 678-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 259-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 458-1349 of SEQ ID NO: 1, and nucleotides 648-1349 of SEQ ID NO: 1.

In a specific embodiment, the whitefly ecdysone receptor ligand binding domain comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, amino acids 193-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-416 of SEQ ID NO: 2, and amino acids 183-416 of SEQ ID NO: 2.

The DNA binding domain can be any DNA binding domain with a known response element, including synthetic and chimeric DNA binding domains, or analogs, combinations, or modifications thereof. Preferably, the DBD is a GAL4 DBD, a LexA DBD, a transcription factor DBD, a steroid/thyroid hormone nuclear receptor superfamily member DBD, such as an EcR DBD, or a bacterial LacZ DBD.

The transactivation domain (abbreviated "AD" or "TA") may be any steroid/thyroid hormone nuclear receptor AD, synthetic or chimeric AD, polyglutamine AD, basic or acidic amino acid AD, a VP16 AD, a GAL4 AD, an NF-κB AD, a BP64 AD, a B42 acidic activation domain (B42AD), a p65 transactivation domain (p65AD), or an analog, combination, or modification thereof. In a specific embodiment, the AD is a synthetic or chimeric AD, or is obtained from an EcR, a glucocorticoid receptor, VP16, GAL4, NF-kB, or B42 acidic activation domain AD.

In a specific embodiment, the gene expression cassette encodes a hybrid polypeptide comprising either a) a DNA-binding domain, or b) a transactivation domain; and a BaEcR ligand binding domain according to the invention.

The present invention also provides a gene expression cassette comprising: i) a response element comprising a domain recognized by a polypeptide comprising a DNA binding domain; ii) a promoter that is activated by a polypeptide comprising a transactivation domain; and iii) a gene whose expression is to be modulated.

The response element ("RE") may be any response element with a known DNA binding domain, or an analog, combination, or modification thereof. A single RE may be employed or multiple REs, either multiple copies of the same RE or two or more different REs, may be used in the present invention. In a specific embodiment, the RE is an RE from GAL4 ("GAL4RE"), LexA, a steroid/thyroid hormone nuclear receptor RE, such as an ecdysone response element (EcRE), or a synthetic RE that recognizes a synthetic DNA binding domain.

A steroid/thyroid hormone nuclear receptor DNA binding domain, activation domain or response element according to the invention may be obtained from a steroid/thyroid hormone nuclear receptor selected from the group consisting of ecdysone receptor (EcR), ubiquitous receptor (UR), orphan receptor 1 (OR-1), steroid hormone nuclear receptor 1 (NER-1), RXR interacting protein–15 (RIP-15), liver x receptor β (LXRβ), steroid hormone receptor like protein (RLD-1), liver x receptor (LXR), liver x receptor α (LXRα), farnesoid x receptor (FXR), receptor interacting protein 14 (RIP-14), farnesol

receptor (HRR-1), thyroid hormone receptor α (TRα), thyroid receptor 1 (c-erbA-1), thyroid hormone receptor β (TRβ), retinoic acid receptor α (RARα), retinoic acid receptor β (RARβ, HAP), retinoic acid receptor γ (RARγ), retinoic acid receptor gamma-like (RARD), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα), peroxisome proliferator-activated receptor β (PPARβ), peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPARδ, NUC-1), peroxisome proliferator-activator related receptor (FFAR), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ), orphan receptor encoded by non-encoding strand of thyroid hormone receptor α (REVERBα), v-erb A related receptor (EAR-1), v-erb related receptor (EAR-1A), γ), orphan receptor encoded by non-encoding strand of thyroid hormone receptor β (REVERBβ), v-erb related receptor (EAR-1β), orphan nuclear receptor BD73 (BD73), rev-erbA-related receptor (RVR), zinc finger protein 126 (HZF2), ecdysone-inducible protein E75 (E75), ecdysone-inducible protein E78 (E78), Drosophila receptor 78 (DR-78), retinoid-related orphan receptor α (RORα), retinoid Z receptor α (RZRα), retinoid related orphan receptor β (RORβ), retinoid Z receptor β (RZRβ), retinoid-related orphan receptor γ (RORγ), retinoid Z receptor γ (RZRγ), retinoid-related orphan receptor (TOR), hormone receptor 3 (HR-3), *Drosophila* hormone receptor 3 (DHR-3), *Manduca* hormone receptor 3 (MHR-3), *Gallaria* hormone receptor 3 (GHR-3), *C. elegans* nuclear receptor 3 (CNR-3), *Choristoneura* hormone receptor 3 (CHR-3), *C. elegans* nuclear receptor 14 (CNR-14), vitamin D receptor (VDR), orphan nuclear receptor (ONR-1), pregnane X receptor (PXR), steroid and xenobiotic receptor (SXR), benzoate X receptor (BXR), nuclear receptor (MB-67), constitutive androstane receptor 1 (CAR-1), constitutive androstane receptor α (CARα), constitutive androstane receptor 2 (CAR-2), constitutive androstane receptor β (CARβ), *Drosophila* hormone receptor 96 (DHR-96), nuclear hormone receptor 1 (NHR-1), hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4), hepatocyte nuclear factor 4G (HNF-4G), hepatocyte nuclear factor 4B (HNF-4B), hepatocyte nuclear factor 4D (HNF-4D, DHNF-4), retinoid X receptor α (RXRα), retinoid X receptor β (RXRβ), H-2 region II binding protein (H-2RIIBP), nuclear receptor co-regulator-1 (RCoR-1), retinoid X receptor γ (RXRγ), Ultraspiracle (USP), 2C1 nuclear receptor, chorion factor 1 (CF-1), testicular receptor 2 (TR-2), testicular receptor 2-11 (TR2-11), testicular receptor 4 (TR4), TAK-1, *Drosophila* hormone receptor (DHR78), Tailless (TLL), tailless homolog (TLX), XTLL, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I (COUP-TFI), chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor A (COUP-TFA), EAR-3, SVP-44, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II (COUP-TFII), chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor B (COUP-TFB), ARP-1, SVP-40, SVP, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor III (COUP-TFIII), chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor G (COUP-TFG), SVP-46, EAR-2, estrogen receptor α (ERα), estrogen receptor β (ERβ), estrogen related receptor 1 (ERR1), estrogen related receptor α (ERRα), estrogen related receptor 2 (ERR2), estrogen related receptor β (ERRβ), glucocorticoid receptor (GR), mineralocorticoid receptor (MR), progesterone receptor (PR), androgen receptor (AR), nerve growth factor induced gene B (NGFI-B),

nuclear receptor similar to Nur-77 (TRS), N10, Orphan receptor (NUR-77), Human early response gene (NAK-1), Nurr related factor 1 (NURR-1), a human immediate-early response gene (NOT), regenerating liver nuclear receptor 1 (RNR-1), hematopoietic zinc finger 3 (HZF-3), Nur related protein -1 (TINOR), Nuclear orphan receptor 1 (NOR-1), NOR1 related receptor (MINOR), *Drosophila* hormone receptor 38 (DHR-38), *C. elegans* nuclear receptor 8 (CNR-8), C48D5, steroidogenic factor 1 (SF1), endozepine-like peptide (ELP), fushi tarazu factor 1 (FTZ-F1), adrenal 4 binding protein (AD4BP), liver receptor homolog (LRH-1), Ftz-F1-related orphan receptor A (xFFrA), Ftz-F1-related orphan receptor B (xFFrB), nuclear receptor related to LRH-1 (FFLR), nuclear receptor related to LRH-1 (PHR), fetoprotein transcription factor (FTF), germ cell nuclear factor (GCNFM), retinoid receptor-related testis-associated receptor (RTR), knirps (KNI), knirps related (KNRL), Embryonic gonad (EGON), *Drosophila* gene for ligand dependent nuclear receptor (EAGLE), nuclear receptor similar to trithorax (ODR7), Trithorax, dosage sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region chromosome X gene (DAX-1), adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism (AHCH), and short heterodimer partner (SHP).

For purposes of this invention, nuclear receptors and whitefly ecdysone receptors also include synthetic and chimeric nuclear receptors and whitefly ecdysone receptors and their homologs.

Antibodies to Whitefly Ecdysone Receptor

According to the invention, a whitefly ecdysone receptor polypeptide produced recombinantly or by chemical synthesis, and fragments or other derivatives or analogs thereof, including fusion proteins, may be used as an antigen or immunogen to generate antibodies. Preferably, the antibodies specifically bind homopteran ecdysone receptor polypeptides, but do not bind other ecdysone receptor polypeptides. More preferably, the antibodies specifically bind a whitefly ecdysone receptor polypeptide, but do not bind other ecdysone receptor polypeptides.

The present invention also relates to antigenic peptides and antibodies thereto. More particularly, the invention relates to antigenic peptides comprising a fragment of a whitefly ecdysone receptor polypeptide according to the invention, wherein the fragment has a property selected from the group consisting of:

(a) it is encoded by a polynucleotide comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of nucleotides 102-258 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 259-457 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 458-677 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 678-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 259-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 458-1349 of SEQ ID NO: 1, and nucleotides 648-1349 of SEQ ID NO: 1;

(b) it comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acids 1-52 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-118 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-192 of SEQ ID NO: 2, amino acids 193-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-416 of SEQ ID NO: 2, and amino acids 183-416 of SEQ ID NO: 2; and

(c) it specifically binds to an antibody generated against an epitope within a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, amino acids 1-52 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-118 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-192 of SEQ ID NO: 2, amino acids 193-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-416 of SEQ ID NO: 2, and amino acids 183-416 of SEQ ID NO: 2.

In another embodiment, the invention relates to an antibody which specifically binds an antigenic peptide comprising a fragment of a whitefly ecdysone receptor polypeptide according to the invention as described above. The antibody may be polyclonal or monoclonal and may be produced by *in vitro* or *in vivo* techniques.

The antibodies of the invention possess specificity for binding to particular homopteran ecdysone receptors. Thus, reagents for determining qualitative or quantitative presence of these or homologous polypeptides may be produced. Alternatively, these antibodies may be used to separate or purify receptor polypeptides.

For production of polyclonal antibodies, an appropriate target immune system is selected, typically a mouse or rabbit. The substantially purified antigen is presented to the immune system in a fashion determined by methods appropriate for the animal and other parameters well known to immunologists. Typical sites for injection are in the footpads, intramuscularly, intraperitoneally, or intradermally. Of course, another species may be substituted for a mouse or rabbit.

An immunological response is usually assayed with an immunoassay. Normally such immunoassays involve some purification of a source of antigen, for example, produced by the same cells and in the same fashion as the antigen was produced. The immunoassay may be a radioimmunoassay, an enzyme-linked assay (ELISA), a fluorescent assay, or any of many other choices, most of which are functionally equivalent but may exhibit advantages under specific conditions.

Monoclonal antibodies with high affinities are typically made by standard procedures as described, e.g., in Harlow and Lane (1988), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; or Goding (1986), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed) Academic Press, New York, which are hereby incorporated herein by reference. Briefly, appropriate animals will be selected and the desired immunization protocol followed. After the appropriate period of time, the spleens of such animals are excised and individual spleen cells fused, typically, to immortalized myeloma cells under appropriate selection conditions. Thereafter, the cells are clonally separated and the supernatants of each clone are tested for their production of an appropriate antibody specific for the desired region of the antigen.

Other suitable techniques involve *in vitro* exposure of lymphocytes to the antigenic polypeptides or alternatively to selection of libraries of antibodies in phage or similar vectors. See, Huse et al., (1989) "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda," Science 246: 1275-1281, hereby incorporated herein by reference.

The polypeptides and antibodies of the present invention may be used with or without modification. Frequently, the polypeptides and antibodies will be labeled by joining, either covalently or non-covalently, a substance which provides for a detectable signal. A wide variety of labels and conjugation techniques are known and are reported extensively in both the scientific and patent literature. Suitable labels include radionuclides, enzymes, substrates, cofactors, inhibitors, fluorescence, chemiluminescence, magnetic particles and the like. Patents, teaching the use of such labels include U.S. Pat. Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; and 4,366,241. Also, recombinant immunoglobulins may be produced, see Cabilly, U.S. Pat. No. 4,816,567.

A molecule is "antigenic" when it is capable of specifically interacting with an antigen recognition molecule of the immune system, such as an immunoglobulin (antibody) or T cell antigen receptor. An antigenic polypeptide contains at least about 5, and preferably at least about 10 amino acids. An antigenic portion of a molecule can be that portion that is immunodominant for antibody or T cell receptor recognition, or it can be a portion used to generate an antibody to the molecule by conjugating the antigenic portion to a carrier molecule for immunization. A molecule that is antigenic need not be itself immunogenic, *i.e.*, capable of eliciting an immune response without a carrier.

Such antibodies include but are not limited to polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and a Fab expression library. The anti-whitefly ecdysone receptor antibodies of the invention may be cross-reactive, *e.g.*, they may recognize whitefly ecdysone receptor from different species. Polyclonal antibodies have greater likelihood of cross reactivity. Alternatively, an antibody of the invention may be specific for a single form of whitefly ecdysone receptor, such as whitefly ecdysone receptor. Preferably, such an antibody is specific for whitefly ecdysone receptor.

Various procedures known in the art may be used for the production of polyclonal antibodies. For the production of antibody, various host animals can be immunized by injection with the whitefly ecdysone receptor polypeptide, or a derivative (*e.g.*, fragment or fusion protein) thereof, including but not limited to rabbits, mice, rats, sheep, goats, etc. In one embodiment, the whitefly ecdysone receptor polypeptide or fragment thereof can be conjugated to an immunogenic carrier, *e.g.*, bovine serum albumin (BSA) or keyhole limpet hemocyanin (KLH). Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, including but not limited to Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanins, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (*bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum*.

For preparation of monoclonal antibodies directed toward the whitefly ecdysone receptor polypeptide, or fragment, analog, or derivative thereof, any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture may be used. These include but are not limited to the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein [*Nature* 256: 495-497 (1975)], as

well as the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique [Kozbor et al., *Immunology Today* 4: 72 1983); Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 2026-2030 (1983)], and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies [Cole et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)]. In an additional embodiment of the invention, monoclonal antibodies can be produced in germ-free animals [International Patent Publication No. WO 89/12690, published 28 December 1989]. In fact, according to the invention, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" [Morrison et al., *J. Bacteriol.* 159: 870 (1984); Neuberger et al., *Nature* 312: 604-608 (1984); Takeda et al., *Nature* 314: 452-454 (1985)] by splicing the genes from a mouse antibody molecule specific for a whitefly ecdysone receptor polypeptide together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used; such antibodies are within the scope of this invention. Such human or humanized chimeric antibodies are preferred for use in therapy of human diseases or disorders (described *infra*), since the human or humanized antibodies are much less likely than xenogenic antibodies to induce an immune response, in particular an allergic response, themselves.

According to the invention, techniques described for the production of single chain Fv (scFv) antibodies [U.S. Patent Nos. 5,476,786 and 5,132,405 to Huston; U.S. Patent 4,946,778] can be adapted to produce whitefly ecdysone receptor polypeptide-specific single chain antibodies. An additional embodiment of the invention utilizes the techniques described for the construction of Fab expression libraries [Huse et al., *Science* 246: 1275-1281 (1989)] to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for a whitefly ecdysone receptor polypeptide, or its derivatives, or analogs.

Antibody fragments which contain the idiotype of the antibody molecule can be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to: the $F(ab')_2$ fragment which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule; the Fab' fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the $F(ab')_2$ fragment, and the Fab fragments which can be generated by treating the antibody molecule with papain and a reducing agent.

In the production of antibodies, screening for the desired antibody can be accomplished by techniques known in the art, *e.g.*, radioimmunoassay, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, *in situ* immunoassays (using colloidal gold, enzyme or radioisotope labels, for example), western blots, precipitation reactions, agglutination assays (*e.g.*, gel agglutination assays, hemagglutination assays), complement fixation assays, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays, etc. In one embodiment, antibody binding is detected by detecting a label on the primary antibody. In another embodiment, the primary antibody is detected by detecting binding of a secondary antibody or reagent to the primary antibody. In a further embodiment, the secondary antibody is labeled. Many means are known in the art for detecting binding in an

immunoassay and are within the scope of the present invention. For example, to select antibodies which recognize a specific epitope of a whitefly ecdysone receptor polypeptide, one may assay generated hybridomas for a product which binds to a whitefly ecdysone receptor polypeptide fragment containing such epitope. For selection of an antibody specific to a whitefly ecdysone receptor polypeptide from a particular species of animal, one can select on the basis of positive binding with whitefly ecdysone receptor polypeptide expressed by or isolated from cells of that species of animal.

The foregoing antibodies can be used in methods known in the art relating to the localization and activity of the whitefly ecdysone receptor polypeptide, *e.g.*, for western blotting, imaging whitefly ecdysone receptor polypeptide *in situ*, measuring levels thereof in appropriate physiological samples, etc. using any of the detection techniques mentioned above or known in the art.

In a specific embodiment, antibodies that agonize or antagonize the activity of whitefly ecdysone receptor polypeptide can be generated. Such antibodies can be tested using the assays described *infra* for identifying ligands. In particular, such antibodies can be scFv antibodies expressed intracellularly.

USES OF NOVEL POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES OF THE INVENTION

The present invention further provides a number of uses for the whitefly ecdysone receptor polynucleotides of the present invention and their encoded polypeptides.

The whitefly ecdysone receptor polypeptides of the present invention have a variety of utilities. For example, the polynucleotides and polypeptides of the invention are useful in methods of modulating gene expression in an ecdysone receptor-based gene expression system. Also included are methods for identifying and selecting ligands specific for binding to a ligand binding domain of a polypeptide of the invention, methods for identifying and selecting compounds exhibiting specific binding to the ligand binding domain and methods for modulating insect physiology or development (e.g., killing).

Methods of Modulating Gene Expression

As presented herein, Applicants' novel polynucleotides and polypeptides are useful in an ecdysone receptor-based gene expression system to provide a regulatable gene expression system in both prokaryotic and eukaryotic host cells. Thus, the present invention also relates to the use of the novel whitefly ecdysone receptor polynucleotides and polypeptides of the present invention in an ecdysone receptor-based gene expression system, and methods of modulating the expression of a gene within a host cell using such an ecdysone receptor-based gene expression system.

This gene expression system may be a "single switch"-based gene expression system in which the transactivation domain, DNA-binding domain and ligand binding domain are on one encoded polypeptide. Alternatively, the gene expression modulation system may be a "dual switch"- or "two-hybrid"-based gene expression modulation system in which the transactivation domain and DNA-binding domain are located on two different encoded polypeptides. Applicants' have demonstrated for the first time that whitefly ecdysone receptor polynucleotides and polypeptides of the invention can be used as a

component of an ecdysone receptor-based inducible gene expression system to modify gene expression in a host cell.

In particular, the present invention relates to a gene expression modulation system comprising at least one gene expression cassette that is capable of being expressed in a host cell comprising a polynucleotide that encodes a whitefly ecdysone receptor polypeptide. Preferably, the whitefly ecdysone receptor polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, amino acids 1-52 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-118 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-192 of SEQ ID NO: 2, amino acids 193-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-416 of SEQ ID NO: 2, and amino acids 183-416 of SEQ ID NO: 2. More preferably, the whitefly ecdysone receptor polypeptide comprises amino acids 193-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-416 of SEQ ID NO: 2, or amino acids 183-416 of SEQ ID NO: 2.

In a specific embodiment, the gene expression modulation system comprises a gene expression cassette comprising a polynucleotide that encodes a polypeptide comprising a transactivation domain, a DNA-binding domain that recognizes a response element associated with a gene whose expression is to be modulated; and a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain (referred to herein as "BaEcR LBD"). The gene expression modulation system may further comprise a second gene expression cassette comprising: i) a response element recognized by the DNA-binding domain of the encoded polypeptide of the first gene expression cassette; ii) a promoter that is activated by the transactivation domain of the encoded polypeptide of the first gene expression cassette; and iii) a gene whose expression is to be modulated.

In another specific embodiment, the gene expression modulation system comprises a gene expression cassette comprising a) a polynucleotide that encodes a polypeptide comprising a transactivation domain, a DNA-binding domain that recognizes a response element associated with a gene whose expression is to be modulated; and an BaEcR LBD, and b) a second nuclear receptor ligand binding domain selected from the group consisting of a vertebrate retinoid X receptor ligand binding domain, an invertebrate retinoid X receptor ligand binding domain, an ultraspiracle protein ligand binding domain, and a chimeric ligand binding domain comprising two polypeptide fragments, wherein the first polypeptide fragment is from a vertebrate retinoid X receptor ligand binding domain, an invertebrate retinoid X receptor ligand binding domain, or an ultraspiracle protein ligand binding domain, and the second polypeptide fragment is from a different vertebrate retinoid X receptor ligand binding domain, invertebrate retinoid X receptor ligand binding domain, or ultraspiracle protein ligand binding domain. The gene expression modulation system may further comprise a second gene expression cassette comprising: i) a response element recognized by the DNA-binding domain of the encoded polypeptide of the first gene expression cassette; ii) a promoter that is activated by the transactivation domain of the encoded polypeptide of the first gene expression cassette; and iii) a gene

whose expression is to be modulated.

In another specific embodiment, the gene expression modulation system comprises a first gene expression cassette comprising a polynucleotide that encodes a first polypeptide comprising a DNA-binding domain that recognizes a response element associated with a gene whose expression is to be modulated and a nuclear receptor ligand binding domain, and a second gene expression cassette comprising a polynucleotide that encodes a second polypeptide comprising a transactivation domain and a nuclear receptor ligand binding domain, wherein one of the nuclear receptor ligand binding domains is an BaEcR LBD. In a preferred embodiment, the first polypeptide is substantially free of a transactivation domain and the second polypeptide is substantially free of a DNA binding domain. For purposes of the invention, "substantially free of a DNA binding domain" means that the protein in question does not contain a sufficient sequence of the domain in question to provide activation or binding activity. The gene expression modulation system may further comprise a third gene expression cassette comprising: i) a response element recognized by the DNA-binding domain of the first polypeptide of the first gene expression cassette; ii) a promoter that is activated by the transactivation domain of the second polypeptide of the second gene expression cassette; and iii) a gene whose expression is to be modulated.

Wherein when only one nuclear receptor ligand binding domain is an BaEcR LBD, the other nuclear receptor ligand binding domain may be from any other nuclear receptor that forms a dimer with the BaEcR LBD. For example, the other nuclear receptor ligand binding domain ("partner") may be from another ecdysone receptor, a vertebrate retinoid X receptor (RXR), an invertebrate RXR, an ultraspiracle protein (USP), or a chimeric nuclear receptor comprising at least two different nuclear receptor ligand binding domain polypeptide fragments selected from the group consisting of a vertebrate RXR, an invertebrate RXR, and a USP (see co-pending applications PCT/US01/09050, US 60/294,814, and US 60/294,819, incorporated herein by reference in their entirety). The "partner" nuclear receptor ligand binding domain may further comprise a truncation mutation, a deletion mutation, a substitution mutation, or another modification.

In a specific embodiment, the whitefly ecdysone receptor ligand binding domain comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, amino acids 193-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-416 of SEQ ID NO: 2, and amino acids 183-416 of SEQ ID NO: 2. In another embodiment, the whitefly ecdysone receptor ligand binding domain is encoded by a polynucleotide comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, nucleotides 102-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 678-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 259-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 458-1349 of SEQ ID NO: 1, and nucleotides 648-1349 of SEQ ID NO: 1.

In a specific embodiment, the gene whose expression is to be modulated is a homologous gene with respect to the host cell. In another specific embodiment, the gene whose expression is to be modulated is a heterologous gene with respect to the host cell.

The ligands for use in the methods of modulating gene expression are described below, when combined with the ligand binding domain of the nuclear receptor(s), which in turn are bound to the response element linked to a gene, provide the means for external temporal regulation of expression of the gene. The binding mechanism or the order in which the various components of this invention bind to each other, that is, for example, ligand to ligand binding domain, DNA-binding domain to response element, transactivation domain to promoter, etc., is not critical.

Thus, Applicants' invention is useful in methods of modulating gene expression in a host cell using a whitefly ecdysone receptor according to the invention. Specifically, Applicants' invention provides a method of modulating the expression of a gene in a host cell comprising the steps of: a) introducing into the host cell an ecdysone receptor-based gene expression modulation system comprising a whitefly ecdysone receptor according to the invention; and b) introducing into the host cell a ligand; wherein the gene to be modulated is a component of a gene expression cassette comprising: i) a response element comprising a domain recognized by the DNA binding domain of the gene expression system; ii) a promoter that is activated by the transactivation domain of the gene expression system; and iii) a gene whose expression is to be modulated, whereby upon introduction of the ligand into the host cell, expression of the gene is modulated.

The invention also provides a method of modulating the expression of a gene in a host cell comprising the steps of: a) introducing into the host cell an ecdysone receptor-based gene expression modulation system comprising a whitefly ecdysone receptor according to the invention; b) introducing into the host cell a gene expression cassette, wherein the gene expression cassette comprises i) a response element comprising a domain recognized by the DNA binding domain from the gene expression system; ii) a promoter that is activated by the transactivation domain of the gene expression system; and iii) a gene whose expression is to be modulated; and c) introducing into the host cell a ligand; whereby upon introduction of the ligand into the host cell, expression of the gene is modulated.

Genes of interest for expression in a host cell using Applicants' methods may be endogenous genes or heterologous genes. Nucleic acid or amino acid sequence information for a desired gene or protein can be located in one of many public access databases, for example, GENBANK, EMBL, Swiss-Prot, and PIR, or in many biology related journal publications. Thus, those skilled in the art have access to nucleic acid sequence information for virtually all known genes. Such information can then be used to construct the desired constructs for the insertion of the gene of interest within the gene expression cassettes used in the methods described herein.

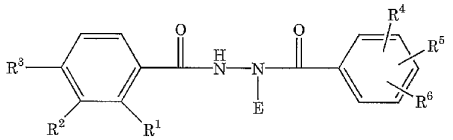
Examples of genes of interest for expression in a host cell using these methods include, but are not limited to: antigens produced in plants as vaccines, enzymes like alpha-amylase, phytase, glucanes, xylase and xylanase, genes for resistance against insects, nematodes, fungi, bacteria, viruses, and abiotic stresses, nutraceuticals, pharmaceuticals, vitamins, genes for modifying amino acid content, herbicide resistance, cold, drought, and heat tolerance, industrial products, oils, protein, carbohydrates,

antioxidants, male sterile plants, flowers, fuels, other output traits, genes encoding therapeutically desirable polypeptides or products that may be used to treat a condition, a disease, a disorder, a dysfunction, a genetic defect, such as monoclonal antibodies, enzymes, proteases, cytokines, interferons, insulin, erthropoietin, clotting factors, other blood factors or components, viral vectors for gene therapy, virus for vaccines, targets for drug discovery, functional genomics, and proteomics analyses and applications, and the like.

The term "ligand" is meant herein to refer to a molecule that binds the domain described here as the "ligand binding domain." Also, a ligand for a whitefly ecdysone receptor is a ligand which serves either as the natural ligand to which the ecdysone receptor binds, or a functional analogue which may serve as an agonist or antagonist.

Acceptable ligands are any that modulate expression of the gene when binding of the DNA binding domain of the gene expression system according to the invention to the response element in the presence of the ligand results in activation or suppression of expression of the genes. Preferred ligands include an ecdysteroid, such as ecdysone, 20-hydroxyecdysone, ponasterone A, muristerone A, and the like, 9-cis-retinoic acid, synthetic analogs of retinoic acid, N,N'-diacylhydrazines such as those disclosed in U. S. Patents No. 6,013,836; 5,117,057; 5,530,028; and 5,378,726; dibenzoylalkyl cyanohydrazines such as those disclosed in European Application No. 461,809; N-alkyl-N,N'-diaroylhydrazines such as those disclosed in U. S. Patent No. 5,225,443; N-acyl-N-alkylcarbonylhydrazines such as those disclosed in European Application No. 234,994; N-aroyl-N-alkyl-N'-aroylhydrazines such as those described in U. S. Patent No. 4,985,461; each of which is incorporated herein by reference and other similar materials including 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-N-isobutyl-benzamide, 8-O-acetylharpagide, and the like.

In a preferred embodiment, the ligand for use in the method of modulating expression of gene is a compound of the formula:



wherein:

E is a (C_4-C_8)alkyl containing a tertiary carbon or a cyano(C_3-C_5)alkyl containing a tertiary carbon;

R^1 is H, Me, Et, i-Pr, F, formyl, CF_3, CHF_2, $CHCl_2$, CH_2F, CH_2Cl, CH_2OH, CH_2OMe, CH_2CN, CN, C≡CH, 1-propynyl, 2-propynyl, vinyl, OH, OMe, OEt, cyclopropyl, CF_2CF_3, CH=CHCN, allyl, azido, SCN, or $SCHF_2$;

R^2 is H, Me, Et, n-Pr, i-Pr, formyl, CF_3, CHF_2, $CHCl_2$, CH_2F, CH_2Cl, CH_2OH, CH_2OMe, CH_2CN, CN, C≡CH, 1-propynyl, 2-propynyl, vinyl, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, O-n-Pr, OAc, NMe_2, NEt_2,

SMe, SEt, $SOCF_3$, OCF_2CF_2H, COEt, cyclopropyl, CF_2CF_3, CH=CHCN, allyl, azido, OCF_3, $OCHF_2$, O-i-Pr, SCN, $SCHF_2$, SOMe, NH-CN, or joined with R^3 and the phenyl carbons to which R^2 and R^3 are attached to form an ethylenedioxy, a dihydrofuryl ring with the oxygen adjacent to a phenyl carbon, or a dihydropyryl ring with the oxygen adjacent to a phenyl carbon;

R^3 is H, Et, or joined with R^2 and the phenyl carbons to which R^2 and R^3 are attached to form an ethylenedioxy, a dihydrofuryl ring with the oxygen adjacent to a phenyl carbon, or a dihydropyryl ring with the oxygen adjacent to a phenyl carbon;

R^4, R^5, and R^6 are independently H, Me, Et, F, Cl, Br, formyl, CF_3, CHF_2, $CHCl_2$, CH_2F, CH_2Cl, CH_2OH, CN, C°CH, 1-propynyl, 2-propynyl, vinyl, OMe, OEt, SMe, or SEt.

In another preferred embodiment, the ligand for use in the method of modulating expression of gene is an ecdysone, 20-hydroxyecdysone, ponasterone A, or muristerone A.

In another preferred embodiment, a second ligand may be used in addition to the first ligand discussed above in the method of modulating expression of a gene. Preferably, this second ligand is 9-cis-retinoic acid or a synthetic analog of retinoic acid.

Screening Assays

Identification and isolation of a polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide of the invention provides for expression of whitefly ecdysone receptor in quantities greater than can be isolated from natural sources, or in indicator cells that are specially engineered to indicate the activity of whitefly ecdysone receptor expressed after transfection or transformation of the cells. Accordingly, in addition to rational design of agonists and antagonists based on the structure of whitefly ecdysone receptor polypeptide, the present invention contemplates an alternative method for identifying specific ligands of whitefly ecdysone receptor using various screening assays known in the art.

Thus, the present invention also relates to methods of screening for a compound that induces or represses transactivation of a whitefly ecdysone receptor polypeptide in a cell by contacting a whitefly ecdysone receptor polypeptide with a candidate molecule and detecting reporter gene activity in the presence of the ligand. Candidate compounds may be either agonists or antagonists of the whitefly ecdysone receptor polypeptide. In a preferred embodiment, the whitefly ecdysone receptor polypeptide is expressed from a polynucleotide in the cell and the transactivation activity (i.e., expression or repression of a reporter gene) or compound binding activity is measured.

In a specific embodiment, the present invention relates to methods of screening for molecules that stimulate or inhibit whitefly ecdysone receptor activity in a cell by contacting a whitefly ecdysone receptor polypeptide with a candidate molecule and detecting whitefly ecdysone receptor activity in the presence of the molecule. Candidate molecules may be either agonists or antagonists of whitefly ecdysone receptor. In a preferred embodiment, the whitefly ecdysone receptor is expressed from a polynucleotide in the cell and the whitefly ecdysone receptor activity measured is by induction of expression or transactivation of a reporter gene. Induction of reporter gene expression can be measured

as described herein.

Thus, one aspect of the present invention is a method for selecting molecules or ligands that modulate the activity of a whitefly ecdysone receptor polypeptide. In a specific embodiment, the present invention provides a method for identifying a ligand specific for binding to a ligand binding domain of a whitefly ecdysone receptor comprising

(a) combining (i) a hybrid polypeptide comprising a whitefly ecdysone receptor ligand binding domain and a DNA binding domain from a steroid hormone nuclear receptor superfamily; and (ii) a polynucleotide encoding a second polypeptide, wherein the polynucleotide is operably linked to a transcriptional control element that is responsive to the DNA binding domain of the hybrid polypeptide;

(b) exposing the hybrid polypeptide and the polynucleotide of (a) to a compound;

(c) determining ligand activity of the compound of (b) by determining induction of expression of the second polypeptide; and

(d) identifying the compound that results in the induction of expression of the second polypeptide.

The present invention is also useful to search for orthogonal ligands and orthogonal receptor-based gene expression systems such as those described in co-pending US application 60/237,446, which is incorporated herein by reference in its entirety.

The ligand binding domain ("LBD") of the ecdysone receptor, specifically binds steroid and non-steroidal agonist ligands, thereby providing a means to screen for new molecules possessing the property of binding with high affinity to the ligand binding domain. Thus, the ligand binding domain of a whitefly ecdysone receptor polypeptide may be used as a reagent to develop a binding assay. On one level, the LBD can be used as an affinity reagent for a batch or in a column selective process, to selectively retain ligands which bind. Alternatively, a functional assay is preferred for its greater sensitivity to ligand-binding. By using a reporter molecule for binding, either through a direct assay for binding, or through an expression or other functional linkage between binding and another function, an assay for binding may be developed. For example, by operable linkage of an easily assayable reporter gene to a controlling element responsive to binding by an ecdysone receptor, and where ligand-binding is functionally linked to protein induction, an extremely sensitive assay for the presence of a ligand or of a receptor results. Such a construct is useful for assaying the presence of 20-hydroxyecdysone is described below. This construct is useful for screening for agonists or antagonists of homopteran ecdysone receptors, in particular, whitefly ecdysone receptors.

As presented herein, a whitefly ecdysone receptor can transactivate gene expression of an ecdysone receptor-based gene expression modulation system. Therefore, agonists of whitefly ecdysone receptor that enhance its ability to transactivate gene expression will be expected to improve its activity in an ecdysone receptor-based gene expression modulation system. Inhibitors (antagonists) of whitefly ecdysone receptor activity are useful to reduce its ability to transactivate an ecdysone receptor-based

gene expression modulation system.

Any screening technique known in the art can be used to screen for whitefly ecdysone receptor agonists or antagonists. For example, a suitable cell line expressing both whitefly ecdysone receptor and an ecdysone receptor-based gene expression modulation system, can be transfected with a nucleic acid encoding a marker gene, such as β-galactosidase. Cells are then exposed to a test solution comprising an agonist or antagonist, and then stained for β-galactosidase activity. The presence of more β-gal positive cells relative to control cells not exposed to the test solution is an indication of the presence of a whitefly ecdysone receptor agonist in the test solution. Conversely, the presence of less β-gal positive cells relative to control cells not exposed to the test solution is an indication of the presence of a whitefly ecdysone receptor antagonist in the test solution.

The present invention contemplates screens for small molecule ligands or ligand analogs and mimics, as well as screens for natural ligands that bind to and agonize or antagonize whitefly ecdysone receptor *in vivo*. For example, natural products libraries can be screened using assays of the invention for molecules that agonize or antagonize whitefly ecdysone receptor activity.

Knowledge of the primary sequence of whitefly ecdysone receptor, and the similarity of that sequence with proteins of known function, can provide an initial clue as the inhibitors or antagonists of the protein. Identification and screening of antagonists is further facilitated by determining structural features of the protein, *e.g.*, using X-ray crystallography, neutron diffraction, nuclear magnetic resonance spectrometry, and other techniques for structure determination. These techniques provide for the rational design or identification of agonists and antagonists.

Another approach uses recombinant bacteriophage to produce large libraries. Using the "phage method" [Scott and Smith, 1990, *Science* 249: 386-390 (1990); Cwirla, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 6378-6382 (1990); Devlin et al., *Science*, 249: 404-406 (1990)], very large libraries can be constructed (10^6-10^8 chemical entities). A second approach uses primarily chemical methods, of which the Geysen method [Geysen et al., *Molecular Immunology* 23: 709-715 (1986); Geysen et al. *J. Immunologic Method* 102: 259-274 (1987)] and the method of Fodor et al. [*Science* 251: 767-773 (1991)] are examples. Furka et al. [*14th International Congress of Biochemistry, Volume 5*, Abstract FR:013 (1988); Furka, *Int. J. Peptide Protein Res.* 37: 487-493 (1991)], Houghton [U.S. Patent No. 4,631,211, issued December 1986] and Rutter et al. [U.S. Patent No. 5,010,175, issued April 23, 1991] describe methods to produce a mixture of peptides that can be tested as agonists or antagonists.

In another aspect, synthetic libraries [Needels et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10700-4 (1993); Ohlmeyer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10922-10926 (1993); Lam et al., International Patent Publication No. WO 92/00252; Kocis et al., International Patent Publication No. WO 9428028, each of which is incorporated herein by reference in its entirety], and the like can be used to screen for whitefly ecdysone receptor ligands according to the present invention.

The screening can be performed with recombinant cells that express the whitefly ecdysone

receptor, or alternatively, using purified protein, *e.g.*, produced recombinantly, as described above. For example, labeled, soluble whitefly ecdysone receptor can be used to screen libraries, as described in the foregoing references.

In one embodiment, whitefly ecdysone receptor may be directly labeled. In another embodiment, a labeled secondary reagent may be used to detect binding of a whitefly ecdysone receptor to a molecule of interest, *e.g.*, a molecule attached to a solid phase support. Binding may be detected by *in situ* formation of a chromophore by an enzyme label. Suitable enzymes include, but are not limited to, alkaline phosphatase and horseradish peroxidase. In a further embodiment, a two-color assay, using two chromogenic substrates with two enzyme labels on different acceptor molecules of interest, may be used. Cross-reactive and singly reactive ligands may be identified with a two-color assay.

Other labels for use in the invention include colored latex beads, magnetic beads, fluorescent labels (e.g., fluorescene isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), Texas red (TR), rhodamine, free or chelated lanthanide series salts, especially Eu^{3+}, to name a few fluorophores), chemiluminescent molecules, radio-isotopes, or magnetic resonance imaging labels. Two-color assays may be performed with two or more colored latex beads, or fluorophores that emit at different wavelengths. Labeled may be detected visually or by mechanical/optical means. Mechanical/optical means include fluorescence activated sorting, *i.e.,* analogous to FACS, and micromanipulator removal means.

As exemplified herein, the level of a whitefly ecdysone receptor polypeptide can be evaluated by metabolic labeling of the proteins. As the metabolic labeling occurs during *in vitro* incubation of the tissue biopsy in the presence of culture medium supplemented with [^{35}S]-methionine, the level of each of the markers detected may be affected by the *in vitro* conditions. In addition to metabolic (or biosynthetic) labeling with [^{35}S]-methionine, the invention further contemplates labeling with [^{14}C]-amino acids and [^{3}H]-amino acids (with the tritium substituted at non-labile positions). Thus, a sample or library of compounds can be directly analyzed after labeling of the proteins therein, *e.g.*, by colorimetric staining using silver, gold, coomassie blue, or amido-schwartz, to mention a few techniques; isotopic labeling, *e.g.*, with [^{32}P]-orthophosphate, [^{125}I], [^{131}I]; fluorescent or chemiluminescent tags; and immunological detection with labeled antibody or specific binding partner of a marker.

Modulating Insect Physiology or Development

The isolation of a whitefly ecdysone receptor provides for isolation or screening of new ligands for receptor binding. Some of these will interfere with, or disrupt, normal insect development. It may sometimes be important to either accelerate or decelerate insect development, for instance, in preparing sterile adults for release. Alternatively, in certain circumstances, a delay or change in the timing of development may be lethal or may dramatically modify the ability of an insect to affect an agricultural crop. Thus, naturally occurring, biodegradable and highly active molecules to disrupt the timing of insect development will result.

The present invention provides a means for disrupting insect development where new ligand

agonists or antagonists are discovered. These compounds are prime candidates as agonists or antagonists to interfere with the normal insect development. By application of new analogues of ligands for a whitefly ecdysone receptor, it is possible to modify the normal temporal sequence of developmental events. For example, accelerating insect development will minimize generation time. This may be very important in circumstances where large numbers of insects are desired finally, for instance, in producing sterile males. Alternatively, it may be useful to slow development in a pest infestation, such that the insects reach destructive stages of development only after commercial crops may have passed sensitive stages. In another commercial application, ligands discovered by methods provided by the present invention may be used to artificially maintain insects in a specific developmental stage. The development of larvae may also be accelerated to reach a particular developmental stage in their life cycle earlier than naturally.

Other analogues of ligands for a whitefly ecdysone receptor may be selected which, upon application, may be completely disruptive of normal development, leading to a lethal result and pest control. Indeed, there may be new ligands for a whitefly ecdysone receptor which may be species specific or may exhibit a particularly useful spectrum of effectiveness. The greater specificity of the ligands will allow avoidance of use of non-specific pesticides possessing undesired deleterious ecological side effects. Furthermore, compounds having structures closely analogous to natural compounds may be susceptible to natural mechanisms of biological degradation.

Thus, the present invention also provides a method for identifying and selecting compounds exhibiting specific binding to the ligand binding domain to modulate insect physiology or development (e.g., killing) comprising the steps of screening compounds for binding to a homopteran ecdysone receptor, selecting compounds exhibiting said binding and administering the ligand to a homopteran insect. In a specific embodiment, a method for modulating insect physiology or development comprises the steps of screening compounds for binding to a whitefly ecdysone receptor, selecting compounds exhibiting said binding and administering the ligand to a whitefly.

Polypeptide Production

A purified whitefly ecdysone receptor polypeptide of the invention is also useful in a method for determining the structural and biosynthetic aspects of the purified whitefly ecdysone receptor polypeptide. Structural studies of interactions of the ligand-binding domains with selected ligands may be performed by various methods. The preferred method for structural determination is X-ray crystallography but may include various other forms of spectroscopy or chromatography. See, e.g., Connolly, M. L., J. Appl. Crystall. 16: 548 (1983); and Connolly, M. L., Science 221: 709 (1983), which are hereby incorporated herein by reference. For example, the structure of the interaction between ligand and ligand-binding domain may be determined to high resolution.

Having provided for the substantially pure polypeptides, biologically active fragments thereof and recombinant polynucleotides encoding them, the present invention also provides cells comprising

each of them. By appropriate introduction techniques well known in the field, cells comprising them may be produced. See, e.g., Sambrook et al. (1989).

HOST CELLS AND NON-HUMAN ORGANISMS

Another aspect of the present invention involves cells comprising an isolated polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide of the present invention. In a specific embodiment, the invention relates to an isolated host cell comprising a vector comprising a polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide of the present invention. The present invention also relates to an isolated host cell comprising an expression vector according to the invention. In another specific embodiment, the invention relates to an isolated host cell comprising a gene expression cassette comprising a polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide of the present invention. In another specific embodiment, the invention relates to an isolated host cell transfected with a gene expression modulation system comprising a polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide of the present invention. In another specific embodiment, the invention also provides an isolated host cell comprising an ecdysone receptor-based gene expression system comprising a whitefly ecdysone receptor polypeptide according to the invention. In another specific embodiment, the invention relates to an isolated host cell comprising a whitefly ecdysone receptor polypeptide of the present invention. In still another embodiment, the invention relates to a method for producing a whitefly ecdysone receptor polypeptide, wherein the method comprises culturing an isolated host cell comprising a polynucleotide encoding a whitefly ecdysone receptor polypeptide of the present invention in culture medium under conditions permitting expression of the polynucleotide encoding the whitefly ecdysone receptor polypeptide, and isolating the whitefly ecdysone receptor polypeptide from the culture.

As described above, the polypeptides of the present invention and the polynucleotides encoding them may be used to modulate gene expression in a host cell. Expression in transgenic host cells may be useful for the expression of various genes of interest. Applicants' invention provides for modulation of gene expression in prokaryotic and eukaryotic host cells. Expression in transgenic host cells is useful for the expression of various polypeptides of interest including but not limited to antigens produced in plants as vaccines, enzymes like alpha-amylase, phytase, glucanase, xylase and xylanase, genes for resistance against insects, nematodes, fungi, bacteria, viruses, and abiotic stresses, antigens, nutraceuticals, pharmaceuticals, vitamins, genes for modifying amino acid content, herbicide resistance, cold, drought, and heat tolerance, industrial products, oils, protein, carbohydrates, antioxidants, male sterile plants, flowers, fuels, other output traits, therapeutic polypeptides, pathway intermediates; for the modulation of pathways already existing in the host for the synthesis of new products heretofore not possible using the host; cell based assays; functional genomics assays, biotherapeutic protein production, proteomics assays, and the like. Additionally the gene products may be useful for conferring higher growth yields of the host or for enabling an alternative growth mode to be utilized.

In a specific embodiment, the isolated host cell is a prokaryotic host cell or a eukaryotic host cell. In another specific embodiment, the isolated host cell is an invertebrate host cell or a vertebrate host cell. Preferably, the isolated host cell is selected from the group consisting of a bacterial cell, a fungal cell, a yeast cell, a nematode cell, an insect cell, a fish cell, a plant cell, an avian cell, an animal cell, and a mammalian cell. More preferably, the isolated host cell is a yeast cell, a nematode cell, an insect cell, a plant cell, a zebrafish cell, a chicken cell, a hamster cell, a mouse cell, a rat cell, a rabbit cell, a cat cell, a dog cell, a bovine cell, a goat cell, a cow cell, a pig cell, a horse cell, a sheep cell, a simian cell, a monkey cell, a chimpanzee cell, or a human cell.

Examples of preferred host cells include, but are not limited to, fungal or yeast species such as *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, or bacterial species such as those in the genera *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Alcaligenes*, *Synechocystis*, *Anabaena*, *Thiobacillus*, *Methanobacterium* and *Klebsiella*; plant species selected from the group consisting of an apple, *Arabidopsis*, bajra, banana, barley, beans, beet, blackgram, chickpea, chili, cucumber, eggplant, favabean, maize, melon, millet, mungbean, oat, okra, *Panicum*, papaya, peanut, pea, pepper, pigeonpea, pineapple, *Phaseolus*, potato, pumpkin, rice, sorghum, soybean, squash, sugarcane, sugarbeet, sunflower, sweet potato, tea, tomato, tobacco, watermelon, and wheat; animal; and mammalian host cells.

In a specific embodiment, the isolated host cell is a yeast cell selected from the group consisting of a *Saccharomyces*, a *Pichia*, and a *Candida* host cell.

In another specific embodiment, the isolated host cell is a *Caenorhabdus elegans* nematode cell.

In another specific embodiment, the isolated host cell is a plant cell selected from the group consisting of an apple, *Arabidopsis*, bajra, banana, barley, beans, beet, blackgram, chickpea, chili, cucumber, eggplant, favabean, maize, melon, millet, mungbean, oat, okra, *Panicum*, papaya, peanut, pea, pepper, pigeonpea, pineapple, *Phaseolus*, potato, pumpkin, rice, sorghum, soybean, squash, sugarcane, sugarbeet, sunflower, sweet potato, tea, tomato, tobacco, watermelon, and wheat cell.

In another specific embodiment, the isolated host cell is a zebrafish cell.

In another specific embodiment, the isolated host cell is a chicken cell.

In another specific embodiment, the isolated host cell is a mammalian cell selected from the group consisting of a hamster cell, a mouse cell, a rat cell, a rabbit cell, a cat cell, a dog cell, a bovine cell, a goat cell, a cow cell, a pig cell, a horse cell, a sheep cell, a monkey cell, a chimpanzee cell, and a human cell.

Host cell transformation is well known in the art and may be achieved by a variety of methods including but not limited to electroporation, viral infection, plasmid/vector transfection, non-viral vector mediated transfection, *Agrobacterium*-mediated transformation, particle bombardment, and the like. Expression of desired gene products involves culturing the transformed host cells under suitable

conditions and inducing expression of the transformed gene. Culture conditions and gene expression protocols in prokaryotic and eukaryotic cells are well known in the art (see General Methods section of Examples). Cells may be harvested and the gene products isolated according to protocols specific for the gene product.

In addition, a host cell may be chosen that modulates the expression of the transfected polynucleotide, or modifies and processes the polypeptide product in a specific fashion desired. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the translational and post-translational processing and modification [*e.g.*, glycosylation, cleavage (*e.g.*, of signal sequence)] of proteins. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the desired modification and processing of the foreign protein expressed. For example, expression in a bacterial system can be used to produce a non-glycosylated core protein product. However, a polypeptide expressed in bacteria may not be properly folded. Expression in yeast can produce a glycosylated product. Expression in eukaryotic cells can increase the likelihood of "native" glycosylation and folding of a heterologous protein. Moreover, expression in mammalian cells can provide a tool for reconstituting, or constituting, the polypeptide's activity. Furthermore, different vector/host expression systems may affect processing reactions, such as proteolytic cleavages, to a different extent.

Applicants' invention also relates to a non-human organism comprising an isolated host cell according to the invention. In a specific embodiment, the non-human organism is a prokaryotic organism or a eukaryotic organism. In another specific embodiment, the non-human organism is an invertebrate organism or a vertebrate organism.

Preferably, the non-human organism is selected from the group consisting of a bacterium, a fungus, a yeast, a nematode, an insect, a fish, a plant, a bird, an animal, and a mammal. More preferably, the non-human organism is a yeast, a nematode, an insect, a plant, a zebrafish, a chicken, a hamster, a mouse, a rat, a rabbit, a cat, a dog, a bovine, a goat, a cow, a pig, a horse, a sheep, a simian, a monkey, or a chimpanzee.

In a specific embodiment, the non-human organism is a yeast selected from the group consisting of *Saccharomyces*, *Pichia*, and *Candida*.

In another specific embodiment, the non-human organism is a *Caenorhabdus elegans* nematode.

In another specific embodiment, the non-human organism is a plant selected from the group consisting of an apple, *Arabidopsis*, bajra, banana, barley, beans, beet, blackgram, chickpea, chili, cucumber, eggplant, favabean, maize, melon, millet, mungbean, oat, okra, *Panicum*, papaya, peanut, pea, pepper, pigeonpea, pineapple, *Phaseolus*, potato, pumpkin, rice, sorghum, soybean, squash, sugarcane, sugarbeet, sunflower, sweet potato, tea, tomato, tobacco, watermelon, and wheat.

In another specific embodiment, the non-human organism is a *Mus musculus* mouse.

MEASURING GENE EXPRESSION/TRANSCRIPTION

One useful measurement of the methods of modulating gene expression using the novel polynucleotides, polypeptides, vectors, and/or gene expression cassettes of the present invention is that of the transcriptional state of the cell including the identities and abundances of RNA, preferably mRNA species. Such measurements are conveniently conducted by measuring cDNA abundances by any of several existing gene expression technologies.

Nucleic acid array technology is a useful technique for determining differential mRNA expression. Such technology includes, for example, oligonucleotide chips and DNA microarrays. These techniques rely on DNA fragments or oligonucleotides which correspond to different genes or cDNAs which are immobilized on a solid support and hybridized to probes prepared from total mRNA pools extracted from cells, tissues, or whole organisms and converted to cDNA. Oligonucleotide chips are arrays of oligonucleotides synthesized on a substrate using photolithographic techniques. Chips have been produced which can analyze for up to 1700 genes. DNA microarrays are arrays of DNA samples, typically PCR products, that are robotically printed onto a microscope slide. Each gene is analyzed by a full-or partial-length target DNA sequence. Microarrays with up to 10,000 genes are now routinely prepared commercially. The primary difference between these two techniques is that oligonucleotide chips typically utilize 25-mer oligonucleotides which allow fractionation of short DNA molecules whereas the larger DNA targets of microarrays, approximately 1000 base pairs, may provide more sensitivity in fractionating complex DNA mixtures.

Another useful measurement of Applicants' methods of the invention is that of determining the translation state of the cell by measuring the abundances of the constituent protein species present in the cell using processes well known in the art.

Where identification of genes associated with various physiological functions is desired, an assay may be employed in which changes in such functions as cell growth, apoptosis, senescence, differentiation, adhesion, binding to a specific molecules, binding to another cell, cellular organization, organogenesis, intracellular transport, transport facilitation, energy conversion, metabolism, myogenesis, neurogenesis, and/or hematopoiesis is measured.

In addition, selectable marker or reporter gene expression may be used to measure gene expression modulation using Applicants' invention.

Other methods to detect the products of gene expression are well known in the art and include Southern blots (DNA detection), dot or slot blots (DNA, RNA), northern blots (RNA), RT-PCR (RNA), western blots (polypeptide detection), and ELISA (polypeptide) analyses. Although less preferred, labeled proteins can be used to detect a particular nucleic acid sequence to which it hybridizes.

In some cases it is necessary to amplify the amount of a nucleic acid sequence. This may be carried out using one or more of a number of suitable methods including, for example, polymerase chain reaction ("PCR"), ligase chain reaction ("LCR"), strand displacement amplification ("SDA"),

transcription-based amplification, and the like. PCR is carried out in accordance with known techniques in which, for example, a nucleic acid sample is treated in the presence of a heat stable DNA polymerase, under hybridizing conditions, with one pair of oligonucleotide primers, with one primer hybridizing to one strand (template) of the specific sequence to be detected. The primers are sufficiently complementary to each template strand of the specific sequence to hybridize therewith. An extension product of each primer is synthesized and is complementary to the nucleic acid template strand to which it hybridized. The extension product synthesized from each primer can also serve as a template for further synthesis of extension products using the same primers. Following a sufficient number of rounds of synthesis of extension products, the sample may be analyzed as described above to assess whether the sequence or sequences to be detected are present.

The present invention may be better understood by reference to the following non-limiting Examples, which are provided as exemplary of the invention.

EXAMPLES

General molecular biology techniques

In accordance with the present invention there may be employed conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, *e.g.*, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Conventional cloning vehicles include pBR322 and pUC type plasmids and phages of the M13 series. These may be obtained commercially (Bethesda Research Laboratories).

For ligation, DNA fragments may be separated according to their size by agarose or acrylamide gel electrophoresis, extracted with phenol or with a phenol/chloroform mixture, precipitated with ethanol and then incubated in the presence of phage T4 DNA ligase (Biolabs) according to the supplier's recommendations.

The filling in of 5' protruding ends may be performed with the Klenow fragment of E. coli DNA polymerase I (Biolabs) according to the supplier's specifications. The destruction of 3' protruding ends is performed in the presence of phage T4 DNA polymerase (Biolabs) used according to the manufacturer's recommendations. The destruction of 5' protruding ends is performed by a controlled treatment with S1

nuclease.

Mutagenesis directed *in vitro* by synthetic oligodeoxynucleotides may be performed according to the method developed by Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] using the kit distributed by Amersham.

The enzymatic amplification of DNA fragments by PCR [Polymerase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. and Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] technique may be performed using a "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) according to the manufacturer's specifications.

Verification of nucleotide sequences may be performed by the method developed by Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467 (1977)] using the kit distributed by Amersham.

Plasmid DNAs may be purified by the Qiagen Plasmid Purification System according to the manufacture's instruction.

Example 1

This Example describes the cloning of full-length cDNA encoding whitefly *Bamecia argentifoli* ecdysone receptor polypeptide. To isolate the full length coding sequence of this previously unknown whitefly ecdysone receptor isoform (herein named "BaEcR"), a whitefly cDNA library prepared from total RNA obtained from mixed stage whitefly nymphs (first to fourth instars) and pupa was used. Briefly, the cDNA library was constructed in the UNI-Zap XR™ vector using Zap Express cDNA Gigapack II Gold™ cloning kit (Stratagene, La Jolla, CA) following the manufacturer's instructions. Applicants used degenerate oligonucleotides (see Table 2; SEQ ID NOs: 3 and 4) designed based on conserved regions of ecdysone receptor C (KKCLSVGM; SEQ ID NO: 5) and E (KLIREDQI; SEQ ID NO: 6) domains to amplify and obtain a 441 base pair (bp) cDNA fragment (SEQ ID NO: 7) from whitefly total RNA using RT-PCR.

Primer and SEQ ID NO:	Primer Nucleic Acid Sequence
Primer 1 (SEQ ID NO: 3)	5'-aa(a/g)aa(a/g)tg(t/c)ct(t/c/a/g)ag(t/c)gt(t/c/a/g)gg(t/c/a/g)atg-3'
Primer 2 (SEQ ID NO: 4)	5'-(a/g/t)at(t/c)tg(a/g)tc(t/c)tc(t/a/c/g)cg(a/g/t)at(t/c/a/g)ag(t/c)tt-3'

Reverse transcription was performed by THERMOSCRIPT RT-PCR System (LifeTechnologies). Polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed using the TaqPlus polymerase (Stratagene) and the reaction conditions and cycling parameters as follows. PCR was performed using 1x reaction buffer (Stratagene), 50 ng of dsDNA template, 125ng of forward primer (Primer 1), 125ng of reverse complementary primer (Primer 2), and 1 μl of dNTP mix (LifeTechnologies) in a final reaction volume of 50 μL. The cycling parameters used consisted of 35 cycles of denaturing at 95°C for 1

minute, annealing at 55°C for 50 seconds, and extending at 72°C for 50 seconds, followed by a final elongation cycle at 72°C for 10 minutes.

The resulting 441 bp cDNA fragment (SEQ ID NO: 7) was then used as a probe to screen the whitefly cDNA library following high stringency hybridization and washing protocols for the full length BaEcR cDNA clone. The hybridization conditions and phage infection methods were performed according to the manufacturer's instructions in the Zap Express cDNA Gigapack II Gold™ cloning kit (Stratagene, La Jolla, CA) and as recommended by Maniatis et al., *supra*. One positive clone was isolated, purified, in-vivo excised, and both strands of its corresponding whitefly cDNA insert sequenced using standard protocols (see Maniatis et al., *supra*).

The polynucleotide sequence of this isolated cDNA clone, which encodes the full length BaEcR, is presented as SEQ ID NO: 1. The deduced amino acid sequence of the full length BaEcR is presented herein as SEQ ID NO: 2 and showed high similarity with the deduced amino acid sequence of other EcRs (data not shown).

Example 2

This Example describes the construction of whitefly ecdysone receptor gene expression cassettes and their use in an ecdysone receptor-based gene expression modulation system. The results presented herein demonstrate that a whitefly ecdysone receptor is functional in an ecdysone receptor-based gene expression modulation system in both insect and mammalian cells.

A) Insect Cells:

Briefly, the BaEcR CDE domains (amino acids 53-416 of SEQ ID NO: 2) were fused to a VP16 transactivation domain (SEQ ID NO: 8) as follows. A construct was prepared by fusing a polynucleotide (nucleotides 259-1349 of SEQ ID NO: 1) encoding a BaEcR-CDE polypeptide to a polynucleotide (SEQ ID NO: 9) encoding a VP16 activation domain at the NH2 terminal end. This VP16BaEcR fusion was then cloned under the control of baculovirus IE1 promoter (SEQ ID NO: 10). The VP16BaEcR gene expression cassette was transfected into L57 cell line (*Drosophila* cell line that lacks endogenous EcR) and a cotton boll weevil ("CBW";*Anthonomus grandis*) BRL-AG-2 cell line (generously provided by USDA, ARS, Bioscience Research Laboratory, Fargo, North Dakota) along with a reporter construct EcRELaCZ that comprises a 6X ECRE response element (1X EcRE is shown in SEQ ID NO: 11), an ADH distal promoter (see Heberlein et al., 1985, Cell 41: 965-977 and Koelle et al. 1991, Cell 67: 59-77) and a LacZ reporter gene (SEQ ID NO: 12). The reporter gene activity was quantified in the presence of 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 μM 20-hydroxyecdysone (20E) ligand or N-(2-ethyl-3-

methoxybenzoyl)-N'-(3,5-dimethylbenzoyl)-N'-tert-butylhydrazine (GS™-E) ligand.

Ligands: The steroid ligand 20-hydroxyecdysone (20E) was purchased from Sigma Chemical Company. The non-steroidal ligand N-(2-ethyl-3-methoxybenzoyl)-N'-(3,5-dimethylbenzoyl)-N'-tert-butylhydrazine (GS™-E) is a synthetic stable ecdysteroid ligand that was synthesized at Rohm and Haas Company. The ligands were dissolved in DMSO and the final concentration of DMSO was maintained at 0.1% in both controls and treatments.

Transfections: DNAs corresponding to the gene constructs described above were transfected into L57 or the CBW cells as follows. L57 cells were grown in HyQ-CCM3 medium (Hyclone labs) and transfected with lipofectomine (Life Technologies). The CBW cells were grown in Ex-Cell 401 (JRH Sciences) and transfected with Celfectin (Invitrogen). Standard methods for culture and maintenance of the cells were followed. Cells were harvested when they reached 50% confluency and plated in 6-, 12- or 24- well plates at 125,000, 50,000, or 25,000 cells, respectively, in 2.5, 1.0, or 0.5 ml of growth medium, respectively. The next day, the cells were rinsed with growth medium and transfected for four hours. For 12- well plates, 4 µl of the appropriate transfection reagent was mixed with 100 µl of growth medium. One µg of reporter construct and 0.25 µg of each receptor construct of the receptor pair to be analyzed were added to the transfection mix. A second reporter construct was added [pTKRL (Promega), 0.1 µg/transfection mix] that comprises a *Renilla* luciferase gene operably linked and placed under the control of a thymidine kinase (TK) constitutive promoter and was used for normalization. The contents of the transfection mix were mixed in a vortex mixer and let stand at room temperature for 30 minutes. At the end of incubation, the transfection mix was added to the cells maintained in 400 µl growth medium. The cells were maintained at 37°C and 5% CO_2 for four hours. At the end of incubation, 500 µl of growth medium and either dimethylsulfoxide (DMSO; control) or a DMSO solution of steroidal ligand or non-steroidal ligand was added and the cells were maintained at 37°C and 5% CO_2 for 48 hours. The cells were harvested and reporter activity was assayed. The same procedure was followed for 6 and 24 well plates as well except all the reagents were doubled for 6 well plates and reduced to half for 24-well plates.

Reporter Assays: Cells were harvested 48 hours after adding ligand. 125 µl of passive lysis buffer (part of Dual-luciferase™ reporter assay system from Promega Corporation) were added to each well of the 24-well plate. The plates were placed on a rotary shaker for 15 minutes. Twenty µl of lysate were assayed. Luciferase activity was measured using Dual-luciferase™ reporter assay system from Promega Corporation following the manufacturer's instructions. β-Galactosidase was measured using Galacto-Star™ assay kit from TROPIX following the manufacturer's instructions. All luciferase and β-galactosidase activities were normalized using *Renilla* luciferase as a standard. Fold activities were calculated by dividing normalized relative light units ("RLU") in ligand treated cells with normalized RLU in DMSO treated cells (untreated control). The results are presented in Figure 1 and the numbers

on the top of each bar show the maximum fold induction for that group.

As shown in Figure 1, the BaEcR construct was able to transactivate reporter gene activity in a dose-dependent manner with both ligands tested in the CBW cells. However, in L57cells there was very little transactivation in the presence of either ligand. Applicants' previous studies have shown that both CfEcR and DmEcR cause good transactivation in L57 but BaEcR was a poor transactivator in these cells.

B) Mammalian Cells:

Briefly, the BaEcR DE domains (amino acids 119-416 of SEQ ID NO: 2) were fused to a GAL4 DNA binding domain (SEQ ID NO: 13) as follows. A construct was prepared by fusing a polynucleotide (nucleotides 458-1349 of SEQ ID NO: 1) encoding a BaEcR-DE polypeptide to a polynucleotide (SEQ ID NO: 14) encoding a GAL4 DNA-binding domain at the NH2 terminal end. This GAL4/BaEcR fusion was then cloned under the control of a cytomegalovirus (CMV) promoter/enhancer (SEQ ID NO: 15). In addition, a polynucleotide encoding the EF domains of seven RXR/USPs from a moth *Choristoneura fumiferana* ultraspiracle protein ("CfUSP", SEQ ID NO: 16), a fruit fly *Drosophila melanogaster* ultraspiracle protein ("DmUSP"; SEQ ID NO: 17), a locust *Locusta migratoria* ultraspiracle protein (LmUSP; SEQ ID NO: 18), a mouse *Mus musculus* retinoid X receptor isoform α (MmRXRα; SEQ ID NO: 19), a chimeric RXR/USP between MmRXRα and LmUSP (Chimera; SEQ ID NO: 20), a tick *Amblyomma americanum* retinoid X receptor homolog 1 (AmaRXR1; SEQ ID NO: 21), and a tick *Amblyomma americanum* retinoid X receptor homolog 2(AmaRXR2; SEQ ID NO: 22) were each fused to a polynucleotide (SEQ ID NO: 9) encoding a VP16 activation domain.

The GAL4/BaEcR gene expression cassette was transfected into NIH3T3 cells (ATCC) along with each of the seven VP16RXR/USP gene expression cassettes and a reporter construct pFRLuc that comprises a 5XGAL4RE (1X GAL4RE is shown in SEQ ID NO: 23), a synthetic TATA (SEQ ID NO: 24) and a luciferase reporter gene (SEQ ID NO: 25) as described above except the cells were cultured in growth media comprising 10% fetal bovine serum (FBS), Superfect™ (Qiagen Inc.) was used as the transfection reagent, and at the end of incubation/transfection, 500 µl of growth medium containing 20% FBS was added to the cells.

The receptor combinations were compared for their ability to transactivate pFRLuc in NIH3T3 cells in the presence of 0, 0.2, 1.0, or 10 µM steroid ponasteroneA (PonA; Invitrogen) or 0, 0.04, 0.2, 1.0, or 10 µM GS™-E. The ligands were dissolved in DMSO and the final concentration of DMSO was maintained at 0.1% in both controls and treatments. The results are presented in Figure 2 and the numbers on the top of each bar show the maximum fold induction for that group.

As shown in Figure 2, BaEcR in combination with any of the RXR/USP receptor constructs tested induced reporter gene activity, indicating that BaEcR is functional in mammalian cells.

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become

apparent to those skilled in the art from the foregoing description. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

It is further to be understood that all base sizes or amino acid sizes, and all molecular weight or molecular mass values, given for nucleic acids or polypeptides are approximate, and are provided for description.

Various publications are cited herein, the disclosures of which are incorporated by reference in their entireties.

We claim:

1. An isolated polynucleotide comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, nucleotides 102-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 102-258 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 259-457 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 458-677 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 678-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 259-1349 of SEQ ID NO: 1, nucleotides 458-1349 of SEQ ID NO: 1, and nucleotides 648-1349 of SEQ ID NO: 1.

2. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, amino acids 1-52 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-118 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-192 of SEQ ID NO: 2, amino acids 193-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-416 of SEQ ID NO: 2, and amino acids 183-416 of SEQ ID NO: 2.

3. A vector comprising the isolated polynucleotide according to claims 1 or 2.

4. The vector according to claim 3, wherein the isolated polynucleotide is operatively linked to an expression control sequence that permits expression of the isolated polynucleotide in an expression competent host cell.

5. The vector according to claim 4, wherein the expression control sequence comprises a promoter that is functional in a mammalian cell.

6. The vector according to claim 4, wherein the vector is selected from the group consisting of an RNA molecule, a plasmid, and a viral vector.

7. The vector according to claim 6, wherein the vector is a plasmid.

8. An isolated host cell transfected with the vector according to claim 3.

9. The isolated host cell according to claim 8, wherein the host cell is selected from the group consisting of a bacterial cell, a fungal cell, a yeast cell, a nematode cell, an insect cell, a fish cell, a plant cell, an avian cell, an animal cell, and a mammalian cell.

10. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, amino acids 1-52 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-118 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-192 of SEQ ID NO: 2, amino acids 193-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 53-416 of SEQ ID NO: 2, amino acids 119-416 of SEQ ID NO: 2, and amino acids 183-416 of SEQ ID NO: 2.

11. A method for producing a whitefly ecdysone receptor polypeptide comprising:

a) culturing the host cell of claim 8 in culture medium under conditions permitting expression of a whitefly ecdysone receptor polypeptide; and

b) isolating the whitefly ecdysone receptor polypeptide from the culture medium.

12. An antibody which specifically binds the isolated polypeptide of claim 10.

13. The antibody of claim 12, wherein the antibody is a monoclonal antibody.

14. A composition comprising the isolated polynucleotide according to claims 1 or 2 and an acceptable carrier.

15. A composition comprising the vector according to claim 3 and an acceptable carrier.

16. A composition comprising the isolated polypeptide according to claim 10 and an acceptable carrier.

17. A method of screening for molecules that modulate whitefly ecdysone receptor activity in a cell, the method comprising:

(a) contacting a cell comprising the isolated polypeptide according to claim 10 with a candidate molecule; and

(b) detecting whitefly ecdysone receptor activity in the presence of the molecule.

18. The method according to claim 17, wherein the molecule is an agonist of whitefly ecdysone receptor.

19. The method according to claim 17, wherein the molecule is an antagonist of whitefly ecdysone receptor.

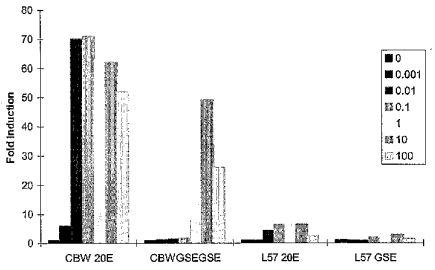

Fold Induction
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CBW 20E
CBWGSEGSE
L57 20E
L57 GSE
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100

Figure 1

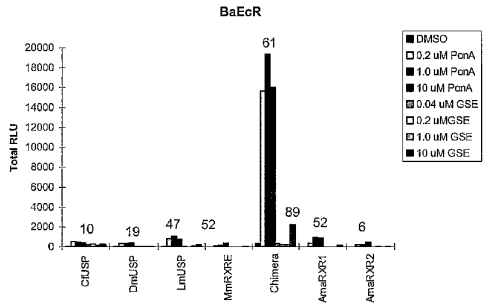

BaEcR
Total RLU
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
10
19
47
52
61
89
52
6
CfUSP
DmUSP
LmUSP
MmRXRE
Chimera
AmaRXR1
AmaRXR2
DMSO
0.2 uM PonA
1.0 uM PonA
10 uM PonA
0.04 uM GSE
0.2 uMGSE
1.0 uM GSE
10 uM GSE

Figure 2

SEQUENCE LISTING

<110> Rohm and Haas Company
Zhang, Jianzhong
Cress, Dean E.
Dhadialla, Tarlochan S.
Palli, Subba Reddy

<120> Whitefly Ecdysone Recpetor Nucleic Acids, Polypeptides, and Uses Thereof

<130> A01248

<150> US 60/325,534
<151> 2001-09-26

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 1586
<212> DNA
<213> Bamecia argentifoli

<400> 1
gaattcgcgg ccgctcgcaa acttccgtac ctctcacccc ctcgccagga ccccccgcca 60

accagttcac cgtcatctcc tccaatggat actcatcccc catgtcttcg ggcagctacg 120

accettatag tcccaccaat ggaagaatag ggaaagaaga gctttcgccg gcgaatagtc 180

tgaacgggta caacgtggat agctgcgatg cgtcgcggaa gaagaaggga ggaacgggtc 240

ggcagcagga ggagctgtgt ctcgtctgcg gggaccgcgc ctccggctac cactacaacg 300

ccctcacctg cgaaggctgc aagggcttct tccgtcggag catcaccaag aatgccgtct 360

accagtgtaa atatggaaat aattgtgaaa ttgacatgta catgaggcga aaatgccaag 420

agtgtcgtct caagaagtgt ctcagcgttg gcatgaggcc agaatgtgta gttcccgaat 480

tccagtgtgc tgtgaagcga aaagagaaaa aagcgcaaaa ggacaaagat aaacctaact 540

caacgacgag ttgttctcca gatggaatca aacaagagat agatcctcaa aggctggata 600

cagattcgca gctattgtct gtaaatggag ttaaacccat tactccagag caagaagagc 660

tcatccatag gctagtttat tttcaaaatg aatatgaaca tccatcccca gaggatatca 720

aaaggatagt taatgctgca ccagaagaag aaaatgtagc tgaagaaagg tttaggcata 780

ttacagaaat tacaattctc actgtacagt taattgtgga attttctaag cgattacctg 840

gttttgacaa actaattcgt gaagatcaaa tagctttatt aaaggcatgt agtagtgaag 900

taatgatgtt tagaatggca aggaggtatg atgctgaaac agattcgata ttgtttgcaa 960

ctaaccagcc gtatacgaga gaatcataca ctgtagctgg catgggtgat actgtggagg 1020

atctgctccg attttgtcga catatgtgtg ccatgaaagt cgataacgca gaatatgctc 1080

ttctcactgc cattgtaatt ttttcagaac gaccatctct aagtgaaggc tggaaggttg 1140

agaagattca agaaatttac atagaagcat taaaagcata tgttgaaaat cgaaggaaac 1200

catatgcaac aaccattttt gctaagttac tatctgtttt aactgaacta cgaacattag 1260

ggaatatgaa ttcagaaaca tgcttctcat tgaagctgaa gaatagaaag gtgccatcct 1320

tcctcgagga gatttgggat gttgtttcat aaacagtctt acctcaattc catgttactt 1380

ttcatatttg atttatctca gcaggtggct cagtacttat cctcacatta ctgagctcac 1440

ggtatgctca tacaattata acttgtaata tcatatcggt gatgacaaat ttgttacaat 1500

attctttgtt accttaacac aatgttgatc tcataatgat gtatgaattt ttctgttttt 1560

gcaaaaaaaa aagcggccgc gaattc 1586

<210> 2
<211> 416
<212> PRT
<213> Bamecia argentifoli

<400> 2

Met Ser Ser Gly Ser Tyr Asp Pro Tyr Ser Pro Thr Asn Gly Arg Ile
1 5 10 15

Gly Lys Glu Glu Leu Ser Pro Ala Asn Ser Leu Asn Gly Tyr Asn Val
20 25 30

Asp Ser Cys Asp Ala Ser Arg Lys Lys Lys Gly Gly Thr Gly Arg Gln
35 40 45

Gln Glu Glu Leu Cys Leu Val Cys Gly Asp Arg Ala Ser Gly Tyr His
50 55 60

Tyr Asn Ala Leu Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser
65 70 75 80

Ile Thr Lys Asn Ala Val Tyr Gln Cys Lys Tyr Gly Asn Asn Cys Glu
85 90 95

Ile Asp Met Tyr Met Arg Arg Lys Cys Gln Glu Cys Arg Leu Lys Lys
100 105 110

Cys Leu Ser Val Gly Met Arg Pro Glu Cys Val Val Pro Glu Phe Gln
115 120 125

Cys Ala Val Lys Arg Lys Glu Lys Lys Ala Gln Lys Asp Lys Asp Lys
130 135 140

```
Pro Asn Ser Thr Thr Ser Cys Ser Pro Asp Gly Ile Lys Gln Glu Ile
145                 150                 155                 160

Asp Pro Gln Arg Leu Asp Thr Asp Ser Gln Leu Leu Ser Val Asn Gly
                165                 170                 175

Val Lys Pro Ile Thr Pro Glu Gln Glu Glu Leu Ile His Arg Leu Val
            180                 185                 190

Tyr Phe Gln Asn Glu Tyr Glu His Pro Ser Pro Glu Asp Ile Lys Arg
        195                 200                 205

Ile Val Asn Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asn Val Ala Glu Glu Arg Phe
    210                 215                 220

Arg His Ile Thr Glu Ile Thr Ile Leu Thr Val Gln Leu Ile Val Glu
225                 230                 235                 240

Phe Ser Lys Arg Leu Pro Gly Phe Asp Lys Leu Ile Arg Glu Asp Gln
                245                 250                 255

Ile Ala Leu Leu Lys Ala Cys Ser Ser Glu Val Met Met Phe Arg Met
            260                 265                 270

Ala Arg Arg Tyr Asp Ala Glu Thr Asp Ser Ile Leu Phe Ala Thr Asn
        275                 280                 285

Gln Pro Tyr Thr Arg Glu Ser Tyr Thr Val Ala Gly Met Gly Asp Thr
    290                 295                 300

Val Glu Asp Leu Leu Arg Phe Cys Arg His Met Cys Ala Met Lys Val
305                 310                 315                 320

Asp Asn Ala Glu Tyr Ala Leu Leu Thr Ala Ile Val Ile Phe Ser Glu
                325                 330                 335

Arg Pro Ser Leu Ser Glu Gly Trp Lys Val Glu Lys Ile Gln Glu Ile
            340                 345                 350

Tyr Ile Glu Ala Leu Lys Ala Tyr Val Glu Asn Arg Arg Lys Pro Tyr
        355                 360                 365

Ala Thr Thr Ile Phe Ala Lys Leu Leu Ser Val Leu Thr Glu Leu Arg
    370                 375                 380
```

Thr Leu Gly Asn Met Asn Ser Glu Thr Cys Phe Ser Leu Lys Leu Lys
385 390 395 400

Asn Arg Lys Val Pro Ser Phe Leu Glu Glu Ile Trp Asp Val Val Ser
405 410 415

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Degenerate EcR PCR primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n = a or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n = a or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n = t or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n = t, c, a or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n = t or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n = t, c, a or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n = t, c, a or g

<400> 3
aanaantgnc tnagngtngg natg 24

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Degenerate EcR PCR primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n = a, g or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n = t or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> n = a or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n = t or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n = t, a, c or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n = a, g or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n = t, c, a or g

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n = t or c

<400> 4
natntgntcn tncgnatna gntt 24

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Conserved EcR C region

<400> 5

Lys Lys Cys Leu Ser Val Gly Met
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Conserved EcR E region

<400> 6

Lys Leu Ile Arg Glu Asp Gln Ile
1 5

<210> 7
<211> 441
<212> DNA
<213> Bamecia argentifoli

<400> 7
aagaagtgtc tcagcgttgg catgaggcca gaatgtgtag ttcccgaatt ccagtgtgct 60

gtgaagcgaa aagagaaaaa agcgcaaaag gacaaagata aacctaactc aacgacgagt 120

tgttctccag atggaatcaa acaagagata gatcctcaaa ggctggatac agattcgcag 180

ctattgtctg taaatggagt taaacccatt actccagagc aagaagagct catccatagg 240

ctagtttatt ttcaaaatga atatgaacat ccatccccag aggatatcaa aaggatagtt 300

aatgctgcac cagaagaaga aaatgtagct gaagaaaggt ttaggcatat tacagaaatt 360

acaatttctca ctgtacagtt aattgtggaa ttttctaagc gattacctgg ttttgacaaa 420

ctaattcgtg aagatcaaat a 441

<210> 8
<211> 90
<212> PRT
<213> herpes simplex virus 7

<400> 8

Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser
1 5 10 15

Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His
20 25 30

Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp
35 40 45

Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala
50 55 60

Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu
65 70 75 80

Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Glu Phe Pro
85 90

<210> 9
<211> 681
<212> DNA
<213> herpes simplex virus 7

<400> 9
atgggcccta aaaagaagaa gcgtaaggtc aaagcgttaa cggccaggct tgaattaatt 60

ccgggcggaa tgaaagcgtt aacggccagg caacaagagg tgtttgatct catccgtgat 120

cacatcagcc agacaggtat gccgccgacg cgtgcggaaa tcgcgcagcg tttggggttc 180

cgttccccaa acgcggctga agaacatctg aaggcgctgg cacgcaaagg cgttattgaa 240

attgtttccg gcgcatcacg cgggattcgt ctgttgcagg aagaggaaga agggttgccg 300

ctggtaggtc gtgtggctgc cggtgaacca cttctggcgc aacagcatat tgaaggtcat 360

tatcaggtcg atccttcctt attcaagccg aatgctgatt tcctgctgcg cgtcagcggg 420

atgtcgatga aagatatcgg cattatggat ggtgacttgc tggcagtgca taaaactcag 480

gatgtacgta acggtcaggt cgttgtcgca cgtattgatg acgaagttac cgttaagcgc 540

ctgaaaaaac agggcaataa agtcgaactg ttgccagaaa atagcgagtt taaaccaatt 600

gtcgtagatc ttcgtcagca gagcttcacc attgaagggc tggcggttgg ggttattcgc 660

aacggcgact ggctggaatt c 681

<210> 10
<211> 703
<212> DNA
<213> Baculovirus

<400> 10
catatgtatc ccgggccagt tgcacaacac tattatcgat ttgcagttcg ggacataaat 60

gtttaaatat atcgatgtct ttgtgatgcg cgcgacattt ttgtaggtta ttgataaaat 120

gaacggatac gttgcccgac attatcatta aatccttggc gtagaatttg tcgggtccat 180

tgtccgtgtg cgctagcatg cccgtaacgg acctcgtact tttggcttca aaggttttgc 240

gcacagacaa aatgtgccac acttgcagct ctgcatgtgt gcgcgttacc acaaatccca 300

acggcgcagt gtacttgttg tatgcaaata aatctcgata aaggcgcggc gcgcgaatgc 360

agctgatcac gtacgctcct cgtgttccgt tcaaggacgg tgttatcgac ctcagattaa 420

tgtttatcgg ccgactgttt tcgtatccgc tcaccaaacg cgtttttgca ttaacattgt 480

atgtcggcgg atgttctata tctaatttga ataaataaac gataaccgcg ttggttttag 540

agggcataat aaaagaaata ttgttatcgt gttcgccatt agggcagtat aaattgacgt 600

tcatgttgga tattgtttca gttgcaagtt gacactggcg gcgacaagat cgtgaacaac 660

caagtgacta tagaattcac tcgaggctag cataagatct aag 703

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Drosophila melanogaster

<400> 11
gagacaaggg ttcaatgcac ttgtccaatg 30

<210> 12
<211> 3157
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 12
atgggggtt ctcatcatca tcatcatcat ggtatggcta gcatgactgg tggacagcaa 60

atgggtcggg atctgtacga cgatgacgat aaggtaccta aggatcagct tggagttgat 120

cccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg ttacccaact taatcgcctt 180

gcagcacatc ccccttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct 240

tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgctttg cctggtttcc ggcaccagaa 300

gcggtgccgg aaagctggct ggagtgcgat cttcctgagg ccgatactgt cgtcgtcccc 360

tcaaactggc agatgcacgg ttacgatgcg cccatctaca ccaacgtaac ctatcccatt 420

acggtcaatc cgccgtttgt tcccacggag aatccgacgg gttgttactc gctcacattt 480

aatgttgatg aaagctggct acaggaaggc cagacgcgaa ttatttttga tggcgttaac 540

tcggcgtttc atctgtggtg caacgggcgc tgggtcggtt acggccagga cagtcgtttg 600

ccgtctgaat ttgacctgag cgcatttttа cgcgccggag aaaaccgcct cgcggtgatg 660

gtgctgcgtt ggagtgacgg cagttatctg gaagatcagg atatgtggcg gatgagcggc 720

attttccgtg acgtctcgtt gctgcataaa ccgactacac aaatcagcga tttccatgtt 780
gccactcgct ttaatgatga tttcagccgc gctgtactgg aggctgaagt tcagatgtgc 840
ggcgagttgc gtgactacct acgggtaaca gtttctttat ggcagggtga aacgcaggtc 900
gccagcggca ccgcgccttt cggcggtgaa attatcgatg agcgtggtgg ttatgccgat 960
cgcgtcacac tacgtctgaa cgtcgaaaac ccgaaactgt ggagcgccga aatcccgaat 1020
ctctatcgtg cggtggttga actgcacacc gccgacggca cgctgattga agcagaagcc 1080
tgcgatgtcg gtttccgcga ggtgcggatt gaaaatggtc tgctgctgct gaacggcaag 1140
ccgttgctga ttcgaggcgt taaccgtcac gagcatcatc ctctgcatgg tcaggtcatg 1200
gatgagcaga cgatggtgca ggatatcctg ctgatgaagc agaacaactt taacgccgtg 1260
cgctgttcgc attatccgaa ccatccgctg tggtacacgc tgtgcgaccg ctacggcctg 1320
tatgtggtgg atgaagccaa tattgaaacc cacggcatgg tgccaatgaa tcgtctgacc 1380
gatgatccgc gctggctacc ggcgatgagc gaacgcgtaa cgcgaatggt gcagcgcgat 1440
cgtaatcacc cgagtgtgat catctggtcg ctggggaatg aatcaggcca cggcgctaat 1500
cacgacgcgc tgtatcgctg gatcaaatct gtcgatcctt cccgcccggt gcagtatgaa 1560
ggcggcggag ccgacaccac ggccaccgat attatttgcc cgatgtacgc gcgcgtggat 1620
gaagaccagc ccttcccggc tgtgccgaaa tggtccatca aaaaatggct ttcgctacct 1680
ggagagacgc gcccgctgat cctttgcgaa tacgcccacg cgatgggtaa cagtcttggc 1740
ggtttcgcta aatactggca ggcgtttcgt cagtatcccc gtttacaggg cggcttcgtc 1800
tgggactggg tggatcagtc gctgattaaa tatgatgaaa acggcaaccc gtggtcggct 1860
tacggcggtg attttggcga tacgccgaac gatcgccagt tctgtatgaa cggtctggtc 1920
tttgccgacc gcacgccgca tccagcgctg acggaagcaa aacaccagca gcagtttttc 1980
cagttccgtt tatccgggca aaccatcgaa gtgaccagcg aatacctgtt ccgtcatagc 2040
gataacgagc tcctgcactg gatggtggcg ctggatggta agccgctggc aagcggtgaa 2100
gtgcctctgg atgtcgctcc acaaggtaaa cagttgattg aactgcctga actaccgcag 2160
ccggagagcg ccgggcaact ctggctcaca gtacgcgtag tgcaaccgaa cgcgaccgca 2220
tggtcagaag ccgggcacat cagcgcctgg cagcagtggc gtctggcgga aaacctcagt 2280
gtgacgctcc ccgccgcgtc ccacgccatc ccgcatctga ccaccagcga aatggatttt 2340
tgcatcgagc tgggtaataa gcgttggcaa tttaaccgcc agtcaggctt tctttcacag 2400
atgtggattg cgcataaaaa acaactgctg acgccgctgc gcgatcagtt cacccgtgca 2460
ccgctggata acgacattgg cgtaagtgaa gcgacccgca ttgaccctaa cgcctgggtc 2520

gaacgctgga aggcggcggg ccattaccag gccgaagcag cgttgttgca gtgcacggca 2580

gatacacttg ctgatgcggt gctgattacg accgctcacg cgtggcagca tcaggggaaa 2640

accttattta tcagccggaa aacctaccgg attgatggta gtggtcaaat ggcgattacc 2700

gttgatgttg aagtggcgag cgatacaccg catccggcgc ggattggcct gaactgccag 2760

ctggcgcagg tagcagagcg ggtaaactgg ctcggattag ggccgcaaga aaactatccc 2820

gaccgcctta ctgccgcctg ttttgaccgc tgggatctgc cattgtcaga catgtatacc 2880

ccgtacgtct tcccgagcga aaacggtctg cgctgcggga cgcgcgaatt gaattatggc 2940

ccacaccagt ggcgcggcga cttccagttc aacatcagcc gctacagtca acagcaactg 3000

atggaaacca gccatcgcca tctgctgcac gcggaagaag gcacatggct gaatatcgac 3060

ggtttccata tggggattgg tggcgacgac tcctggagcc cgtcagtatc ggcggaatta 3120

cagctgagcg ccggtcgcta ccattaccag ttggtct 3157

<210> 13
<211> 147
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 13

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu
1 5 10 15

Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu
20 25 30

Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro
35 40 45

Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu
50 55 60

Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile
65 70 75 80

Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu
85 90 95

Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala
100 105 110

Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser
115 120 125

Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu
130 135 140

Thr Val Ser
145

<210> 14
<211> 441
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 14
atgaagctac tgtcttctat cgaacaagca tgcgatattt gccgacttaa aaagctcaag 60

tgctccaaag aaaaaccgaa gtgcgccaag tgtctgaaga acaactggga gtgtcgctac 120

tctcccaaaa ccaaaaggtc tccgctgact agggcacatc tgacagaagt ggaatcaagg 180

ctagaaagac tggaacagct atttctactg atttttcctc gagaagacct tgacatgatt 240

ttgaaaatgg attctttaca ggatataaaa gcattgttaa caggattatt tgtacaagat 300

aatgtgaata aagatgccgt cacagataga ttggcttcag tggagactga tatgcctcta 360

acattgagac agcatagaat aagtgcgaca tcatcatcgg aagagagtag taacaaaggt 420

caaagacagt tgactgtatc g 441

<210> 15
<211> 750
<212> DNA
<213> Cytomegalovirus

<400> 15
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60

ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120

aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180

gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240

gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300

agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360

ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg cccccattg acgtcaatga 420

cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480

gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac 540

caatgggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600

caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactg 660

cgatcgcccg ccccgttgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata 720

agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc 750

<210> 16
<211> 798
<212> DNA
<213> Choristoneura fumiferana

<400> 16
tcggtgcagg taagcgatga gctgtcaatc gagcgcctaa cggagatgga gtctttggtg 60

gcagatccca gcgaggagtt ccagttcctc cgcgtggggc ctgacagcaa cgtgcctcca 120

cgttaccgcg cgcccgtctc ctccctctgc caaataggca acaagcaaat agcggcgttg 180

gtggtatggg cgcgcgacat ccctcatttc gggcagctgg agctggacga tcaagtggta 240

ctcatcaagg cctcctggaa tgagctgcta ctcttcgcca tcgcctggcg ctctatggag 300

tatttggaag atgagaggga gaacggggac ggaacgcgga gcaccactca gccacaactg 360

atgtgtctca tgcctggcat gacgttgcac cgcaactcgg cgcagcaggc gggcgtgggc 420

gccatcttcg accgcgtgct gtccgagctc agtctgaaga tgcgcacctt gcgcatggac 480

caggccgagt acgtcgcgct caaagccatc gtgctgctca accctgatgt gaaaggactg 540

aagaatcggc aagaagttga cgttttgcga gaaaaaatgt tctcttgcct ggacgactac 600

tgccggcggt cgcgaagcaa cgaggaaggc cggtttgcgt ccttgctgct gcggctgcca 660

gctctccgct ccatctcgct caagagcttc gaacacctct acttcttcca cctcgtggcc 720

gaaggctcca tcagcggata catacgagag gcgctccgaa accacgcgcc tccgatcgac 780

gtcaatgcca tgatgtaa 798

<210> 17
<211> 799
<212> DNA
<213> Drosophila melanogaster

<400> 17
catagaggcc gagcagcgag cggagaccca atgcggcgat cgtgcactga cgttcctgcg 60

cgttggtccc tattccacag tccagccgga ctacaagggt gccgtgtcgg ccctgtgcca 120

agtggtcaac aaacagctct tccagatggt cgaatacgcg cgcatgatgc cgcactttgc 180

ccaggtgccg ctggacgacc aggtgattct gctgaaagcc gcttggatcg agctgctcat 240

tgcgaacgtg gcctggtgca gcatcgtttc gctggatgac ggcggtgccg gcggcggggg 300

cggtggacta ggccacgatg gctcctttga gcgacgatca ccgggccttc agcccagca 360

gctgttcctc aaccagagct tctcgtacca tcgcaacagt gcgatcaaag ccggtgtgtc 420

agccatcttc gaccgcatat tgtcggagct gagtgtaaag atgaagcggc tgaatctcga 480

ccgacgcgag ctgtcctgct tgaaggccat catactgtac aacccggaca tacgcgggat 540

caagagccgg gcggagatcg agatgtgccg cgagaaggtg tacgcttgcc tggacgagca 600

ctgccgcctg gaacatccgg gcgacgatgg acgctttgcg caactgctgc tgcgtctgcc 660

cgctttgcga tcgatcagcc tgaagtgcca ggatcacctg ttcctcttcc gcattaccag 720

cgaccggccg ctggaggagc tctttctcga gcagctggag gcgccgccgc cacccggcct 780

ggcgatgaaa ctggagtag 799

<210> 18
<211> 635
<212> DNA
<213> Locusta migratoria

<400> 18
tgcatacaga catgcctgtt gaacgcatac ttgaagctga aaaacgagtg gagtgcaaag 60

cagaaaacca agtggaatat gagctggtgg agtgggctaa acacatcccg cacttcacat 120

ccctacctct ggaggaccag gttctcctcc tcagagcagg ttggaatgaa ctgctaattg 180

cagcattttc acatcgatct gtagatgtta aagatggcat agtacttgcc actggtctca 240

cagtgcatcg aaattctgcc catcaagctg gagtcggcac aatatttgac agagttttga 300

cagaactggt agcaaagatg agagaaatga aaatggataa aactgaactt ggctgcttgc 360

gatctgttat tcttttcaat ccagaggtga ggggtttgaa atccgcccag gaagttgaac 420

ttctacgtga aaaagtatat gccgctttgg aagaatatac tagaacaaca catcccgatg 480

aaccaggaag atttgcaaaa cttttgcttc gtctgccttc tttacgttcc ataggcctta 540

agtgtttgga gcatttgttt ttctttcgcc ttattggaga tgttccaatt gatacgttcc 600

tgatggagat gcttgaatca ccttctgatt cataa 635

<210> 19
<211> 714
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 19
gccaacgagg acatgcctgt agagaagatt ctggaagccg agcttgctgt cgagcccaag 60

actgagacat acgtggaggc aaacatgggg ctgaacccca gctcaccaaa tgaccctgtt 120

accaacatct gtcaagcagc agacaagcag ctcttcactc ttgtggagtg ggccaagagg 180

atcccacact tttctgagct gcccctagac gaccaggtca tcctgctacg ggcaggctgg 240

aacgagctgc tgatcgcctc cttctcccac cgctccatag ctgtgaaaga tgggattctc 300

ctggccaccg gcctgcacgt acaccggaac agcgctcaca gtgctggggt gggcgccatc 360

tttgacaggg tgctaacaga gctggtgtct aagatgcgtg acatgcagat ggacaagacg 420

gagctgggct gcctgcgagc cattgtcctg ttcaaccctg actctaaggg gctctcaaac 480

cctgctgagg tggaggcgtt gagggagaag gtgtatgcgt cactagaagc gtactgcaaa 540

cacaagtacc ctgagcagcc gggcaggttt gccaagctgc tgctccgcct gcctgcactg 600

cgttccatcg ggctcaagtg cctggagcac ctgttcttct tcaagctcat cggggacacg 660

cccatcgaca ccttcctcat ggagatgctg gaggcaccac atcaagccac ctag 714

<210> 20
<211> 711
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chimeric MmRXRalpha/LmUSP-EF

<400> 20
gccaacgagg acatgcctgt agagaagatt ctggaagccg agcttgctgt cgagcccaag 60

actgagacat acgtggaggc aaacatgggg ctgaacccca gctcaccaaa tgaccctgtt 120

accaacatct gtcaagcagc agacaagcag ctcttcactc ttgtggagtg ggccaagagg 180

atcccacact tttctgagct gcccctagac gaccaggtca tcctgctacg ggcaggctgg 240

aacgagctgc tgatcgcctc cttctcccac cgctccatag ctgtgaaaga tgggattctc 300

ctggccaccg gcctgcacgt acaccggaac agcgctcaca gtgctggggt gggcgccatc 360

tttgacaggg tgctaacaga gctggtgtct aagatgcgtg acatgcagat ggacaagact 420

gaacttggct gcttgcgatc tgttattctt ttcaatccag aggtgagggg tttgaaatcc 480

gcccaggaag ttgaacttct acgtgaaaaa gtatatgccg ctttggaaga atatactaga 540

acaacacatc ccgatgaacc aggaagattt gcaaaacttt tgcttcgtct gccttcttta 600

cgttccatag gccttaagtg tttggagcat ttgtttttct ttcgccttat tggagatgtt 660

ccaattgata cgttcctgat ggagatgctt gaatcacctt ctgattcata a 711

<210> 21
<211> 687
<212> DNA
<213> Amblyomma americanum

<400> 21
cctcctgaga tgcctctgga gcgcatactg gaggcagagc tgcgggttga gtcacagacg 60

gggaccctct cggaaagcgc acagcagcag gatccagtga gcagcatctg ccaagctgca 120

gaccgacagc tgcaccagct agttcaatgg gccaagcaca ttccacattt tgaagagctt 180

ccccttgagg accgcatggt gttgctcaag gctggctgga acgagctgct cattgctgct 240

ttctcccacc gttctgttga cgtgcgtgat ggcattgtgc tcgctacagg tcttgtggtg 300

cagcggcata gtgctcatgg ggctggcgtt ggggccatat ttgatagggt tctcactgaa 360

ctggtagcaa agatgcgtga gatgaagatg gaccgcactg agcttggatg cctgcttgct 420

gtggtacttt ttaatcctga ggccaagggg ctgcggacct gcccaagtgg aggccctgag 480

ggagaaagtg tatctgcctt ggaagagcac tgccggcagc agtacccaga ccagcctggg 540

cgctttgcca agctgctgct gcggttgcca gctctgcgca gtattggcct caagtgcctc 600

gaacatctct ttttcttcaa gctcatcggg gacacgccca tcgacaactt tcttctttcc 660

atgctggagg ccccctctga cccctaa 687

<210> 22
<211> 693
<212> DNA
<213> Amblyomma americanum

<400> 22
tctccggaca tgccactcga acgcattctc gaagccgaga tgcgcgtcga gcagccggca 60

ccgtccgttt tggcgcagac ggccgcatcg ggccgcgacc ccgtcaacag catgtgccag 120

gctgcccccgc cacttcacga gctcgtacag tgggcccggc gaattccgca cttcgaagag 180

cttcccatcg aggatcgcac cgcgctgctc aaagccggct ggaacgaact gcttattgcc 240

gcctttcgc accgttctgt ggcggtgcgc gacggcatcg ttctggccac cgggctggtg 300

gtgcagcggc acagcgcaca cggcgcaggc gttggcgaca tcttcgaccg cgtactagcc 360

gagctggtgg ccaagatgcg cgacatgaag atggacaaaa cggagctcgg ctgcctgcgc 420

gccgtggtgc tcttcaatcc agacgccaag ggtctccgaa acgccaccag agtagaggcg 480

ctccgcgaga aggtgtatgc ggcgctggag gagcactgcc gtcggcacca ccccggaccaa 540

ccgggtcgct tcggcaagct gctgctgcgg ctgcctgcct tgcgcagcat cgggctcaaa 600

tgcctcgagc atctgttctt cttcaagctc atcggagaca ctcccataga cagcttcctg 660

ctcaacatgc tggaggcacc ggcagacccc tag 693

<210> 23
<211> 17
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 23
cggagtactg tcctccg 17

<210> 24
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic TATAA

<400> 24
tagagggtat ataatggatc cccgggtacc 30

<210> 25
<211> 1705
<212> DNA
<213> Photinus pyralis

<400> 25
atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agaggatgga 60

accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tggaacaatt 120

gcttttacag atgcacatat cgaggtgaac atcacgtacg cggaatactt cgaaatgtcc 180

gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgta 240

tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tatcggagtt 300

gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgaacatt 360

tcgcagccta ccgtagtgtt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaacgtgcaa 420

aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttaccaggga 480

tttcagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatacgat 540

tttgtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcctctgga 600

tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt cagattctcg 660

catgccagag atcctatttt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat tttaagtgtt 720

gttccattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgtggattt 780

cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcaggattac 840

aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tcttcgccaa aagcactctg 900

attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggcgc acctctttcg 960

aaagaagtcg gggaagcggt tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatacg acaaggatat 1020

gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg agggggatga taaaccgggc 1080

gcggtcggta aagttgttcc atttttgaa gcgaaggttg tggatctgga taccgggaaa 1140

acgctgggcg ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatgtccggt 1200

tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct 1260

ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttcá tagttgaccg cttgaagtct 1320

ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attgttacaa 1380

caccccaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggtgaactt 1440

cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500

tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagttgt gtttgtggac 1560

gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatcctcata 1620

aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taaaatgtaa ctgtattcag cgatgacgaa 1680

attcttagct attgtaatac tctag 1705

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
3 April 2003 (03.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/027266 A3

(51) International Patent Classification⁷: G01N 33/567, C07K 14/00, 16/00, C12P 21/06, C12N 5/02, 15/74

(21) International Application Number: PCT/US2002/005234

(22) International Filing Date: 20 February 2002 (20.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/325,534 26 September 2001 (26.09.2001) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): RHEOGENE HOLDINGS, INC. [US/US]; 2650 Eisenhower Avenue, Norristown, PA 19403 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): ZHANG, Jianzhong [CA/US]; #24-C-2 Lower State Road, North Wales, PA 19545 (US). CRESS, Dean, Ervin [US/US]; 104 Leslie Lane, Sounderton, PA 18964 (US). PALLI, Subba, Reddy [CA/US]; 832 Garfield Avenue, Lansdale, PA 19446 (US). DHADIALLA, Tarlochan, Singh [KE/US]; 108 Ridge Court, Chalfont, PA 18914 (US).

(74) Agent: JOLLY-TORNETTA, Camille; Rohm an Haas Company, 100 Independence Mall West, Philadelphia, PA 19106-2399 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:
— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

(88) Date of publication of the international search report:
21 October 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2003/027266 A3

(54) Title: WHITEFLY ECDYSONE RECEPTOR NUCLEIC ACIDS, POLYPEPTIDES, AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to a novel isolated whitefly ecdysone receptor polypeptide. The invention also relates to an isolated nucleic acid encoding the whitefly ecdysone receptor polypeptide, to vectors comprising them and to their uses, in particular in methods for modulating gene expression in an ecdysone receptor-based gene expression modulation system and methods for identifying molecules that modulate whitefly ecdysone receptor activity.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/05234

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : G01N 33/567; C07K 14/00, 16/00; C12P 21/06; C12N 5/02, 15/74
US CL : 435/ 7.1, 69.1, 320.1, 325; 530/350, 387.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/ 7.1, 69.1, 320.1, 325; 530/350, 387.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
STN, EAST; serach terms: ecdysone, ecdysteroid, whitefly

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	MOUILLET, J-F. et al. Cloning of Two Putative Ecdysteroid Receptor Isoforms from Tenebrio molitor and their Developmental Expression in the Epidermis During Metamorphosis. Eur. J. Biochem. 1997, Vol. 248, No. 3, pp. 856-863, especially pages 858 and 862.	1-11 --- 12-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 May 2004 (24.05.2004)

Date of mailing of the international search report
29 AUG 2004

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 872-9304

Authorized officer
Janet Andres
Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 48/00	Ａ６１Ｋ 48/00		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ 33/14	Ａ６１Ｐ 33/14		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ 43/00	Ａ６１Ｐ 43/00	１１１	４Ｃ０８７
Ｃ０７Ｋ 14/705	Ｃ０７Ｋ 14/705		４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ 16/28	Ｃ０７Ｋ 16/28		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ	
Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ１２Ｑ 1/02		
Ｃ１２Ｑ 1/02	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
// Ｃ１２Ｐ 21/08	Ａ６１Ｋ 37/02		
	Ｃ１２Ｐ 21/08		

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 パリ，サバ・レディ
アメリカ合衆国ケンタッキー州４０５１３，レキシントン，ラベル・シーティー．２２３６
(72)発明者 クレス，ディーン・アービン
アメリカ合衆国ペンシルバニア州１９４６８，ロイヤーズフォード，モーガン・ドライブ・３１２
(72)発明者 ダジアラ，タロチャン・シング
アメリカ合衆国インディアナ州４６０７７，ザイオンズビル，バージャー・レーン・３９０８

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 BA43 BA63 CA04 DA02 EA02 EA04 GA11 HA12 HA15
4B063 QA18 QQ20 QQ42 QQ52 QQ79 QR55 QR59 QR62 QR77 QR80
QR82 QS24 QS25 QS33 QS34 QX01
4B064 AG20 AG27 CA10 CA19 CC24 DA12 DA13
4B065 AA90X AA90Y AA91X AA92X AB01 AB04 AC14 BA02 CA24 CA25
CA46 CA48
4C084 AA01 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA49 DC50
MA63 NA14 ZB37
4C085 AA13 AA14 CC40
4C086 AA01 AA02 AA03 BC42 BC43 CB07 DA38 EA17 EA18 MA01
MA04 MA63 NA14 ZB37
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA63 NA14 ZB37
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 DA76 DA86 EA06
EA50 FA72 FA74